



Le vieillissement de la peau et du follicule pileux : de la caractérisation clinique à l'étude fonctionnelle

Claire Deloche

► To cite this version:

Claire Deloche. Le vieillissement de la peau et du follicule pileux : de la caractérisation clinique à l'étude fonctionnelle. Dermatologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066537 . tel-01319888

HAL Id: tel-01319888

<https://theses.hal.science/tel-01319888>

Submitted on 23 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

L'OREAL RECHERCHE ET INNOVATION
Laboratoires soin Lancôme
188-200 rue Paul Hochart
94 550 CHEVILLY-LARUE

**UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
DOSSIER DE VALIDATION DES ACQUIS DE L'EXPERIENCE POUR
L'OBTENTION D'UN DOCTORAT**

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie, Thérapeutique (ED394)

Présentée par C. DELOCHE le 17 avril 2015

Sujet de la thèse: **Le vieillissement de la peau et du follicule pileux:
de la caractérisation clinique à l'étude fonctionnelle**

Devant le jury composé de :

Pr Joëlle Sobczak-Thépot
Dr Florence Debacq-Chainiaux
Dr Bernard Coulomb
Pr Bertrand Friguet
Dr Bruno Bernard
Mme France Uebersfeld

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Responsable du pôle REVA

REMERCIEMENTS

C'est à ces chercheurs passionnés, sur lesquels le temps n'a pas de prise, qui m'ont formée au métier de chercheur et qui ont eu confiance en moi pendant toutes ces années que j'adresse mes remerciements:

Au Pr Chollet, oncologue au Centre Jean Perrin de Clermont-Ferrand, qui a éveillé mon goût pour la recherche.

Au Dr Bruno Bernard, chercheur senior et L'Oréal Fellow, qui m'a transmis une infime partie de son savoir, sa passion pour la recherche, son goût pour l'excellence, et qui m'a insufflé ses idées brillantes. Son enthousiasme, sa générosité et son soutien à mon égard sont à l'origine de la concrétisation de mon parcours de chercheur chez L'Oréal par cette thèse.

Au Pr Bertrand Friguet, mon référent scientifique à l'université Pierre et Marie Curie, pour avoir accepté d'encadrer mon travail de rédaction, par ses conseils, ses commentaires, et sa complicité avec le Dr Bernard. Je voudrais leur dire à quel point j'ai apprécié leur grande disponibilité et leurs qualités humaines.

Aux Professeurs Isabelle Cremer, Catherine Monnot et J. Sobczak-Thepot, qui m'ont donné leur accord pour mon inscription à l'école doctorale de l'UPMC ED394: physiologie, physiopathologie et thérapeutique.

Je voudrais également remercier Mme France Uebersfeld, responsable du pôle validation des acquis d'expérience (VAE), d'avoir accepté de m'aiguiller durant ces années de VAE et d'encadrer la première partie de mon travail.

Je voudrais aussi exprimer ma profonde gratitude au jury de cette thèse, en particulier au Dr Florence Debacq-Chainiaux et au Dr Bernard Coulomb qui ont accepté le rôle « ingrat » de rapporteurs, et à M. Alain Gonzalez, directeur de la formation continue, pour avoir accepté d'être examinateur.

Je remercie L'Oréal et les Ressources Humaines en particulier qui m'ont apporté leur aide et m'ont donné l'opportunité de réaliser, avec tout l'espace de liberté nécessaire, ce travail de thèse qui s'est déroulé dans le cadre du programme de Valorisation des Acquis d'Expérience.

Plus personnellement un grand merci à Marie Annick Chabbert, professeur de lettres, pour son amitié de toujours et sa relecture précieuse, ainsi qu'à Marine Pegeon, ma proche collaboratrice, pour ses conseils dans la mise en forme de ma thèse.

Enfin, je dédie ce travail à ma famille proche et à mes amis, à ceux qui veillent sur moi depuis l'au-delà ainsi qu'à et ceux qui me soutiennent quotidiennement avec générosité et patience dans mes nombreux projets. A tous mes amis, à ma sœur, Anne, et à mon mari, Amine, je tiens à vous assurer que je suis au seuil de mon épanouissement professionnel et personnel, et donc tout près de l'équilibre dont il est question dans mon manuscrit...

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN:Acide Désoxyribonucléique	4E-BP 1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ALT:Alternative Lengthening of Telomeres	WS: Syndrome de Werner
ATP:Adénosine Triphosphate	PPAR γ :Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
AMP:Adénosine Monophosphate	
AMPk:AMP-activated protein kinase	
ATM:Ataxia Telangiectasia Mutated	
ATR: <u>A</u> TM and <u>R</u> ad3-related kinase	
ARF:Alternative Reading Frame	
CDK:Cyclin-Dependant Kinase	
CTGF:Connective Tissue Growth Factor	
DNA pol γ :DNA polymerase γ	
DDR:DNA Damage Response	
FOXO:facteurs de transcription de type <i>Forkhead</i>	
GAGs:glycosaminoglycans	
GH: Growth Hormone	
GHRH:Growth Hormone-Releasing Hormone	
HSF-1:Heat shock factor protein 1	
HSR:Heat shock response	
HGPS: syndrome de Hutchinson-Gilford	
HP1:Hétérochromatine 1	
IGFBP : Insuline-like Growth factor Binding Protein	
IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1	
IIS: Insulin/ IGF signaling cascade	
JNK: c-Jun N-terminal kinases	
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin	
NK:Natural Killer	
NF-KB:Nuclear Factor KB	
NOD: Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins	
NOTCH:voie de signalisation (gène NOTCH)	
NuRD:Nucleosome Remodelling Deacetylase	
OXPHOS: Oxidative Phosphorylation	
PAPP-A:Protéine plasmatique placentaire A	
Parkin:RBR E3 ubiquitin protein ligase	
PcG: protéines du groupe Polycomb	
PGs:Protéoglycans	
PDK-3' phosphoinositide-kinase 1 dépendante 1	
PGC-1 α : peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α	
PI3K:phosphatidylinositol 3-kinase	
PINK1:PTEN-induced putative kinase 1	
PKB (ou AKT): protéine kinase B	
pRb:protéine de retinoblastoma	
PRC:PGC-1 related coactivator)	
RC:restriction calorique	
ROS:Reactive Oxygen Species	
S6K1: p70 ribosomal S6 kinase	
Tert: télomérase réverse transcriptase	
TGF- β 1:transforming growth factor- β 1	
TRF2: Telomeric Repeat binding Factor 2	
TrxG:groupe Trithorax	

SOMMAIRE

1	LE VIEILLISSEMENT : ETAT DES CONNAISSANCES	5
1.1	DÉFINITIONS : VIEILLISSEMENT / SÉNESCENCE/ LONGÉVITÉ.....	5
1.1.1	Le vieillissement : processus dynamique.....	5
1.1.2	La sénescence : processus statique	6
1.1.3	La longévité.....	7
1.1.4	Sénescence et longévité	8
1.2	CAUSES ET/OU CONSÉQUENCES DU VIEILLISSEMENT.....	10
1.2.1	Diversité des causes et conséquences.....	10
1.2.1.1	Dérégulation de la sensibilité aux nutriments	10
1.2.1.1.1	Voie de l'insuline et IGF-1	11
1.2.1.1.2	Signalisation de mTOR	15
1.2.1.1.3	AMP kinase	16
1.2.1.1.4	Sirtuines	17
1.2.1.2	Dysfonctionnement des mitochondries.....	17
1.2.1.2.1	Métabolisme oxydatif ROS	17
1.2.1.2.2	Altérations de l'intégrité des mitochondries et biogénèse	23
1.2.1.2.2.1	Le métabolisme mitochondrial	23
1.2.1.2.2.2	Mutation de l'ADNmt	27
1.2.1.2.2.3	Dysfonctionnement des télomères	29
1.2.1.2.2.4	Mitophagie, vieillissement et maladies neurodégénératives.....	30
1.2.1.3	Instabilité génomique	32
1.2.1.3.1	ADN nucléaire	35
1.2.1.3.2	ADN mitochondrial	36
1.2.1.3.3	Architecture nucléaire	37
1.2.1.4	Raccourcissement des télomères	38
1.2.1.5	Altérations épigénétiques.....	43
1.2.1.5.1	Méthylation de l'ADN	44
1.2.1.5.2	Silence épigénétique des gènes progéroïdes	46
1.2.1.5.3	Modification des histones.....	46
1.2.1.5.4	Remodelage de la chromatine.....	51
1.2.1.5.5	Altérations transcriptionnelles	52
1.2.1.6	Modifications post-traductionnelles non-enzymatiques des protéines.....	53

1.2.1.6.1	Rôle des protéines chaperonnes	55
1.2.1.6.2	Systèmes protéolytiques	56
1.2.1.7	Les cellules souches	60
1.2.1.8	Sénescence.....	64
1.2.1.9	Altération de la communication intercellulaire	71
1.3	CAUSES ET /OU CONSEQUENCES DU VIEILLISSEMENT DANS LA PEAU ET LE CHEVEU.....	75
1.3.1	Vieillessement intrinsèque et extrinsèque	75
1.3.2	Focus sur le vieillissement des différents compartiments de la peau	82
1.3.2.1	L'épiderme	82
1.3.2.2	La jonction dermo-épidermique	87
1.3.2.3	Le derme	89
1.3.3	Focus sur le vieillissement du follicule pileux et du scalp.....	97
1.3.3.1	Impact de l'âge sur la croissance du cheveu.....	97
1.3.3.2	Impact de l'âge sur le blanchissement du cheveu	102
1.3.3.3	Le vieillissement du scalp.....	102
2	TRAVAUX DE RECHERCHE SUR LE VIEILLISSEMENT DE LA TIGE PILAIRE.....	105
2.1	CONTEXTE 1	105
2.2	Question posée	106
2.2.1	Abstract.....	106
2.2.2	Résultats et Conclusion.....	106
2.3	Question posée	110
2.3.1	Abstract.....	110
2.3.2	Résultats et Conclusion.....	111
2.4	CONTEXTE 2	113
2.4.1	Question posée	113
2.4.2	Abstract.....	113
2.4.3	Résultats et Conclusion.....	114
3	TRAVAUX DE RECHERCHE SUR LE VIEILLISSEMENT DE LA PEAU	117
3.1	CONTEXTE	117
3.1.1	Question posée-N°1.....	118
3.1.2	Abstract.....	119
3.1.3	Résultats et Conclusion.....	119
3.1.4	Question posée-N°2.....	119
3.1.5	Abstract.....	120

3.1.6	Résultats et Conclusion	120
3.1.7	Question posée-N°3.....	121
3.1.7.1	Etape 1 - Etude clinique	121
3.1.7.2	Etape 2 - Etudes biologiques.....	122
3.1.7.2.1	Approche transcriptomique.....	122
3.1.7.2.2	Abstract.....	122
3.1.7.2.3	Résultats et Conclusion.....	123
3.1.7.2.4	Approche histologique.....	125
3.1.7.2.5	Abstract.....	126
3.1.7.2.6	Résultats et Conclusion.....	126
4	AUTRES TRAVAUX DE RECHERCHE SUR LE VIEILLISSEMENT.....	130
4.1	CONTEXTE	130
4.2	Question posée	130
4.3	Abstract.....	130
4.4	Résultats et Conclusion.....	131
5	DISCUSSION GENERALE.....	132
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	135
	ANNEXES – PUBLICATIONS TRAVAUX SCIENTIFIQUES	171
	-Articles Cheveu - Annexes 1 à 3	
	-Articles Peau - Annexes 4 à 8	
	-Autres travaux	

1 LE VIEILLISSEMENT : ETAT DES CONNAISSANCES

1.1 DÉFINITIONS : VIEILLISSEMENT / SÉNESCENCE/ LONGÉVITÉ

Dans le cas d'un organisme vivant, le vieillissement est un processus naturel ou exacerbé par divers stress - subis in utero ou au long de la vie - qui conduit le plus souvent cet organisme à ne plus assurer son équilibre physiologique, ce qui l'entraîne à la mort.

Chez l'homme, le vieillissement est un processus complexe, lent et progressif, qui implique divers facteurs biologiques, psychologiques et sociaux. Ces facteurs sont en partie génétiques (vieillissement intrinsèque), et en partie liés à l'histoire de vie de chacun (facteurs externes de vieillissement, acquis ou subis). Le vieillissement de certaines cellules commence dès la naissance, voire in utero (Mentis et Kararizou, 2010 ; Fernandez-Capetillo, 2010).

La perte progressive de l'intégrité physiologique conduit à des altérations fonctionnelles et à une vulnérabilité aux maladies, comme notamment le cancer, le diabète, les troubles cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives.

De façon plus générale, le vieillissement peut être défini comme un déclin fonctionnel, dépendant du temps, qui affecte la plupart des organismes vivants.

Les organismes multicellulaires contiennent, en fonction des tissus concernés, deux types cellulaires fondamentalement différents : les cellules post-mitotiques qui ne se divisent plus ou rarement (exemple : cellules musculaires, cellules nerveuses) et les cellules qui peuvent se diviser (exemple : cellules épithéliales intestinales, cellules épithéliales cutanées). Une mort excessive des cellules dans les tissus post-mitotiques concourt à des états de dégénérescence alors que les échecs dans le programme de mort cellulaire lors du renouvellement cellulaire contribuent à l'hyperplasie et au cancer (Green, 2011).

1.1.1 Le vieillissement : processus dynamique

Le vieillissement, processus dynamique (**Figure 1**), est associé à des altérations qualitatives et quantitatives de certains marqueurs au cours du temps. Généralement, à chaque cycle cellulaire des cellules «mitotiquement compétentes», les télomères se raccourcissent. Les tissus sont toujours capables de se renouveler, de se réparer et, dans certains cas, de se régénérer. C'est l'accumulation de dommages cellulaires qui est considérée comme étant la cause générale du vieillissement (Gems et Patrige, 2013).

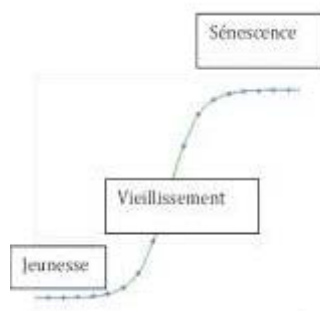


Figure 1 - Vieillesse

1.1.2 La sénescence : processus statique

La sénescence, « processus statique » (**Figure 1**), est la phase ultime du vieillissement. Il s'agit d'un processus post-mitotique caractérisé par un état qui touche des cellules qui ne se divisent plus et un ensemble de marqueurs spécifiques. Historiquement, ce phénomène a été décrit *in vitro* sur fibroblastes : les cellules humaines normales effectuent une première phase de croissance exponentielle, puis entrent dans un plateau de sénescence (**Figure 2**) (Hayflick, 1965).

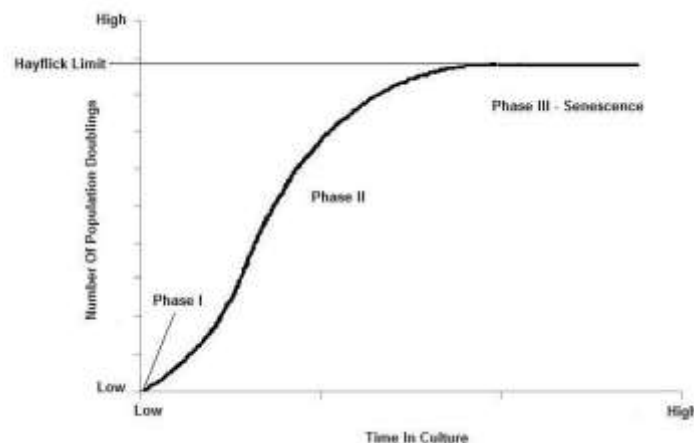


Figure 2 - Les 3 phases d'Hayflick (Hayflick, 1965)

Phase I: légère prolifération avant le 1er passage ↔ Etablissement de la culture
Phase II : prolifération cellulaire rapide
Phase III : atteinte d'un plateau jusqu'à un arrêt total

Cet état est également atteint *in vivo* et il a été montré que l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus avec l'âge est responsable d'un certain nombre de pathologies associées à l'âge (Baker, 2011).

En plus de l'arrêt irréversible du cycle cellulaire par l'activation des voies p53/p21 et p16/Rb (Lowe, 2004), les cellules sénescents présentent de nombreuses modifications morphologiques, métaboliques et génétiques :

- * Augmentation de la taille de la cellule jusqu'à un facteur 10
- * Polynucléation de 20% des cellules
- * Résistance à l'apoptose (Wang, 1995)
- * Accumulation de dommages oxydants (augmentation du taux de fluorescence dû à l'accumulation de lipofuscine) (von Zglinicki, 1995)
- * Augmentation d'activité autophagique (Brondello, 2012)
- * Activité de la SA- β galactosidase (lysosomiale) à pH=6 (Dimri, 1995)
- * Sécrétion inflammatoire

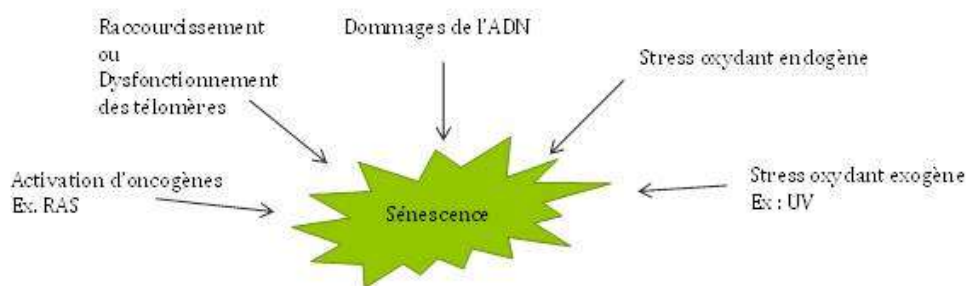


Figure 3 - Principaux mécanismes inducteurs de sénescence

La sénescence est un état physiologique dont les causes ou stress incriminés peuvent correspondre:

- soit au dysfonctionnement télomérique consécutif aux phases répétées de réplication. Il a été proposé que cette érosion des télomères, reconnue par les cellules comme de l'ADN endommagé, puisse activer la réponse au stress génotoxique (induction de p53 par exemple) qui est identique à celle qu'induisent les rayonnements ionisants, d'où le nom de sénescence réplivative (d'Adda di Fagagna, 2003).
- soit à l'accumulation de dommages à l'ADN, au stress oxydatif qui survient dans des conditions de culture cellulaire non adaptées, aux dysfonctions mitochondriales ou encore à l'activation de certains oncogènes comme Myc, Ras ou Raf. (Tchkonia, 2013). On parle alors de sénescence induite par le stress.

Il s'agit donc d'un état physiologique qui peut être accéléré par des stress exogènes comme les radiations ionisantes ou UV (**Figure 3**).

1.1.3 La longévité

C'est la résultante du vieillissement et de la sénescence en termes de durée de vie. La durée de vie (longévité) est différente en fonction des espèces (**Tableau 1**).

Espèce animale	Longévité maximale (moyenne)
Levure	30 à 40 divisions
<i>C. elegans</i>	1 mois
<i>Drosophila Melanogaster</i>	2-3 semaines
Poisson zèbre	3 ans
Souris	2 ans
Rat taupe	30 ans
Oursin <i>Lythechenius variegatus</i>	3-4 ans
Oursin rouge <i>Strongylocentrotus franciscanus</i>	100 ans
Tortue	200 ans
<i>Homo sapiens</i>	100 ans
Pétoncle d'Alaska	400 ans
Homard	100 ans

Tableau 1 - Longévité maximale inter-espèces

Nous essaierons de comprendre plus loin quels sont les mécanismes moléculaires qui signent ces différences de longévité.

1.1.4 Sénescence et longévité

Par certains de ses aspects, la sénescence est considérée comme un modèle du vieillissement cellulaire et de l'organisme (Campisi, 1996), mais la relation entre sénescence et âge n'est toujours pas établie. De plus, de nombreuses études suggèrent fortement que la sénescence joue un rôle dans la suppression des tumeurs (Campisi, 2005).

Il existe des mécanismes physiologiques et cellulaires communs entre la sénescence et le vieillissement.

-Un trait commun entre la sénescence *in vitro* et le vieillissement chez l'homme est le raccourcissement des télomères. Pour les fibroblastes humains, par exemple, la longueur moyenne des télomères décroît de 50pb par doublement de culture et 15 pb par an chez des donneurs âgés (Allsopp, 1992).

En revanche, la télomérase est relativement abondante dans les cellules germinales répliquatives, les kératinocytes (Boukamp, 2005), les cellules tumorales et les eucaryotes inférieurs chez lesquels la longueur des télomères est stable.

-Le marqueur commun largement répandu est la β galactosidase acide (SA- β -gal), qui est définie comme une activité β galactosidase détectable à PH6. L'expression de son activité a été retrouvée dans de nombreux types cellulaires en sénescence ainsi que dans des organes d'animaux et de personnes âgées (Dimri, 1995). Cependant, de nombreuses études sont contradictoires car elles n'ont pas permis de montrer son activité dans certains tissus âgés, comme la peau par exemple (Severino, 2000). Enfin, plus récemment, des auteurs ont montré que l'activité de ce marqueur - largement utilisé comme biomarqueur spécifique de sénescence - avait pour origine les lysosomes et qu'il n'était pas nécessaire à l'entrée en sénescence car des fibroblastes en culture, issus de patients atteints de gangliosidose (n'exprimant pas la β gal), rentraient en sénescence répliquative après plusieurs passages en culture (Lee, 2006).

-Les cellules sénescents et les tissus âgés sont plus sensibles à une variété de stress. A une échelle moléculaire, l'expression de la protéine chaperonne HSP70 (marqueur de mécanisme cellulaire de protection des organismes vivants de l'hyperthermie et d'autres types de stress) et le taux de mRNA sont nettement diminués dans des cellules sénescents humaines *in vitro* et dans les cellules dérivées de sujets âgés comparées à des cellules dérivées de sujets jeunes (fibroblastes de poumon, fibroblastes épidermiques et mélanocytes épidermiques) (Gutsmann-Conrad, 1998).

-Si le taux de dommage à l'ADN dépasse un certain seuil, les cellules sont destinées à s'orienter vers l'apoptose ou la sénescence. Les facteurs qui amènent à telle ou telle voie ne sont pas encore bien déterminés, mais le type de cellule, l'intensité et la durée du signal comme la nature du dommage sont très certainement des discriminants importants (d'Adda di Fagagna, 2008).

De par les mécanismes cellulaires communs, nous allons considérer, dans cette revue sur le vieillissement, la sénescence comme un des marqueurs ultimes du vieillissement.

Récemment, des auteurs (Lopez-Otin, 2013) ont proposé 9 marqueurs de l'âge qui contribuent au processus du vieillissement et qui, ensemble, déterminent le phénotype lié au vieillissement (**Figure 4**).

Ici, nous proposons de décrire ces marqueurs, leurs interconnexions, dont on sait qu'elles vont être déterminantes dans le processus du vieillissement, et ce grâce à l'étude de différents modèles. Ainsi, l'étude de ces marqueurs communs ou spécifiques à ces différentes espèces devrait permettre d'apporter un éclairage sur leur degré de pertinence pour leur extrapolation à l'homme.

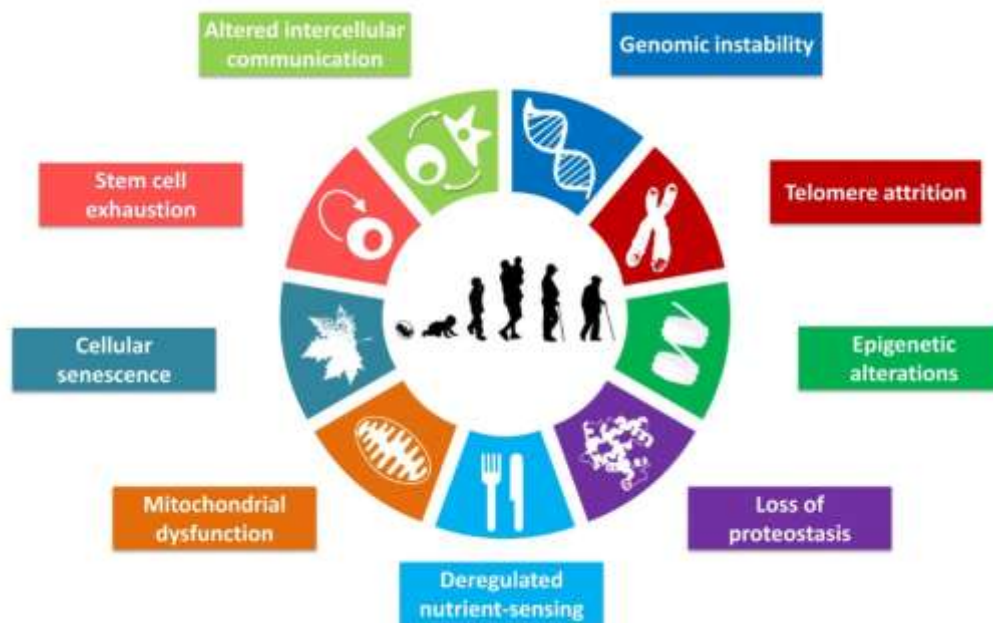


Figure 4 - The Hallmarks of aging (Lopez-Otin, 2013)

1.2 CAUSES ET/OU CONSÉQUENCES DU VIEILLISSEMENT

1.2.1 Diversité des causes et conséquences

1.2.1.1 Dérégulation de la sensibilité aux nutriments

L'axe somatotrophique chez les mammifères comprend l'hormone de croissance (GH) produite par le lobe antérieur de l'hypophyse et son médiateur IGF-1 (insulin-like growth factor 1) en réponse à GH par de nombreux types cellulaires, notamment par les hépatocytes (**Figure 5**). La voie intracellulaire d'IGF-1 est la même que celle activée par l'insuline, qui informe les cellules de la présence de glucose. Pour cette raison, les 2 voies de signalisation sont connues sous le nom d'IIS (Insulin/ IGF signaling cascade) (Lopez-Otin, 2013).

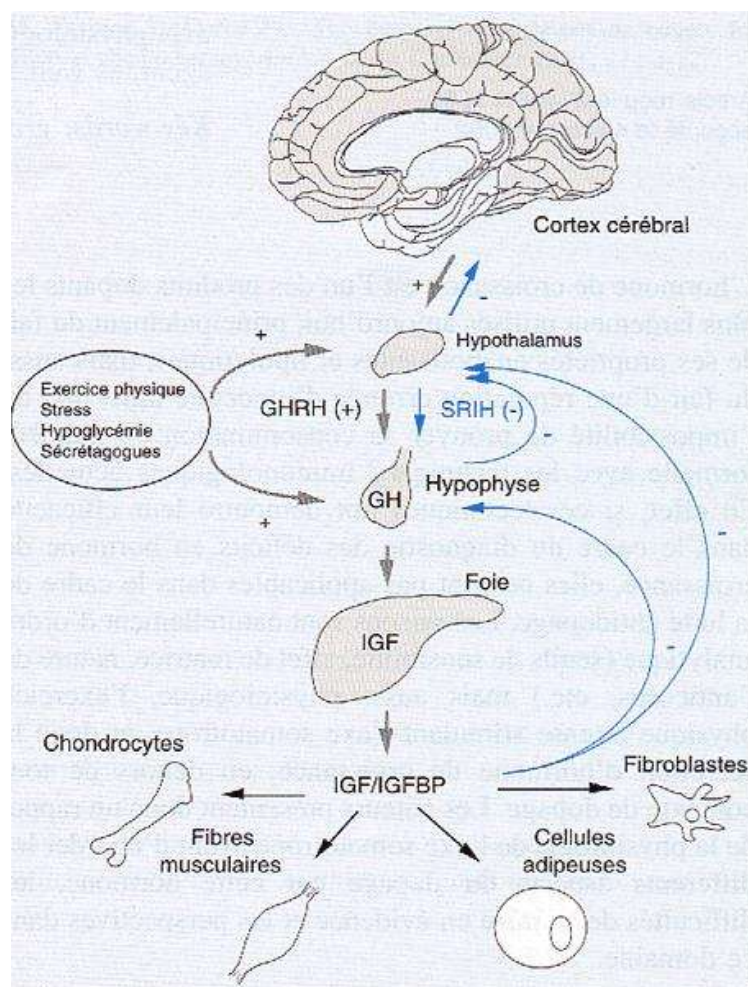


Figure 5 - Physiologie de l'axe somatotrope (Pélissier-Alicot, 2003)

SRIH: somatotrope release-inhibiting hormone ou somatostatine ; GHRH : growth hormone-releasing hormone ou somatocrinine ; IGF : insuline-like growth factor ou somatomédine ; IGFBP : insuline-like growth factor binding protein.

La voie insuline/IGF-1 est la première voie de signalisation à avoir été décrite dans les années 1990 comme pouvant influencer le vieillissement dans la régulation de la durée de vie chez *C. elegans* : la perte de fonction due à la mutation *daf-2* (gène qui code pour le récepteur de IGF-1) a permis de montrer que la durée de vie chez ce ver était doublée (Kenyon, 1993).

Ainsi, des capteurs de nutriments et de stress modulent la durée de vie en réponse à de nombreux signaux environnementaux et physiologiques. Le plus connu de ces signaux est la restriction calorique (RC) décrite dans de nombreuses espèces, depuis la levure jusqu'aux primates (Colman, 2009). Outre le fait que la longévité en réponse à la RC est régulée par des voies métaboliques impliquant la kinase- cible de la rapamycine (mTOR)-, l'AMP kinase, des sirtuines et le facteur de croissance IGF1, il a aussi été montré récemment chez la drosophile que la RC provoquait une diminution brutale du taux de mortalité, ce qui suggère que la RC peut aussi contrecarrer le vieillissement de façon soudaine (Mair, 2003).

Remarques: Bien que des polymorphismes génétiques ou des mutations des voies de signalisation de l'insuline/ IGF1 aient permis de montrer une extension de la durée de vie chez C. elegans, la drosophile et la souris (Bluher, 2003 ; Holzenberger, 2003 ; Kenyon, 2010), les mécanismes de cette extension, soit par une diminution du risque de mort, soit en lien avec le taux d'accumulation des dommages, soit les deux, restent à élucider.

Enfin, alors que plusieurs études ont démontré que la restriction calorique rallongeait la durée de vie chez C. elegans, la levure, la drosophile et la souris, qu'elle améliorait le statut de santé chez les rongeurs et les mammifères (Bratic et Larsson, 2013), cela reste à démontrer chez l'homme.

1.2.1.1.1 Voie de l'insuline et IGF-1

L'insuline joue un rôle anabolique majeur au niveau de l'organisme, dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques, qu'ils soient glucidiques ou lipidiques : entrée de glucose, synthèse de glycogène et lipogenèse, inhibition de la glycogénolyse, de la néoglucogenèse et de la lipolyse. Elle exerce également des fonctions pléiotropes sur le métabolisme protéique (augmentation de la synthèse et inhibition de la protéolyse), la croissance, le contrôle de l'apoptose et le développement. Ses effets résultent de sa liaison à un récepteur membranaire spécifique exprimé en priorité sur ces trois tissus cibles : le foie, le muscle et le tissu adipeux (Capeau, 2003).

Les molécules de cette voie incluent la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K ; AGE-1 chez *C. elegans*), 3' phosphoinositide-kinase 1 dépendante (PDK-1), AKT (connue aussi sous le nom de PKB) et des facteurs transcriptionnels de la famille des « Forkhead box » FOXO (=forkhead box, de classe O) (DAF-16 chez *C. elegans*). En réponse à l'insuline et IGF-1, PI3K active PDK-1 qui, à son tour, active AKT ; puis, AKT phosphoryle de multiples cibles en aval pour assurer la survie et la croissance cellulaire (**Figure 6**).

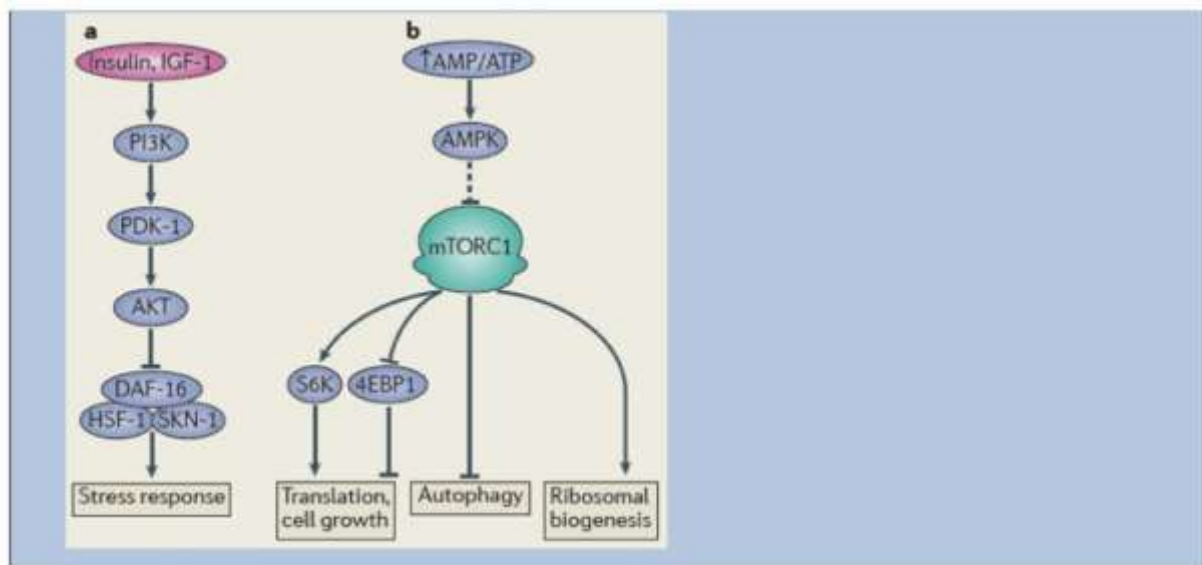


Figure 6 - Voies de signalisation de l'insuline (Insulin/ IGF-1 signaling « IIS ») et mTOR. (Sahin et DePinho, 2012).

La diminution de l'activité de la voie de l'insuline et d'IGF-1, à cause de la perte de fonction due à des mutations de gènes codant pour des composants essentiels à cette voie ou codant pour des protéines qui régulent cette activité telles que des hormones de croissance, rallonge la durée de vie dans beaucoup d'espèces comme le ver nématode, la drosophile et la souris (Fontana, 2010). L'extension de la durée de vie chez ces mutants est médiée par de nombreux facteurs de transcription et leurs cibles, incluant DAF-A6, la protéine de choc thermique facteur 1 (HSF-1) et SKN-1 (un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress oxydatif), lesquels stimulent l'expression de gènes qui augmentent la résistance au stress, la défense oxydative et la fonction mitochondriale (Kenyon, 2010). Ces facteurs de transcription, chacun à leur tour, régulent positivement ou négativement divers gènes qui agissent de façon cumulative pour produire de larges effets sur la durée de vie. Il a été montré, par exemple, que certains gènes en aval de la réponse au stress étaient significativement fonctionnels comme, d'une part, les catalases, les glutathion- S-transférases, les métallothionines et, d'autre part, des gènes codant pour des peptides anti-microbiens, des protéines chaperonnes, des apolipoprotéines et des lipases (Wang, 2008).

Les perturbations de la voie de l'insuline et d'IGF-1 dans un tissu peuvent être répercutées dans un autre tissu pour retrouver une nouvelle homéostasie. Par exemple, chez *C. elegans*, de type sauvage, l'augmentation de l'activité de DAF16 dans un tissu est activée ailleurs, via un mécanisme de régulation de feedback de l'expression du gène de l'insuline (Murphy, 2007). D'autres facteurs, tels que HSF-1 et SKN-1, peuvent aussi réguler d'autres cellules différentes de celles où ils agissent. Ainsi, ce réseau complexe d'interactions tissus-tissus semble être très important dans la régulation de l'âge des différents tissus.

L'effet de la voie de l'insuline sur l'extension de la durée de vie a été très bien conservé au cours de l'évolution (**Figure 7**) (Kenyon, 2010).

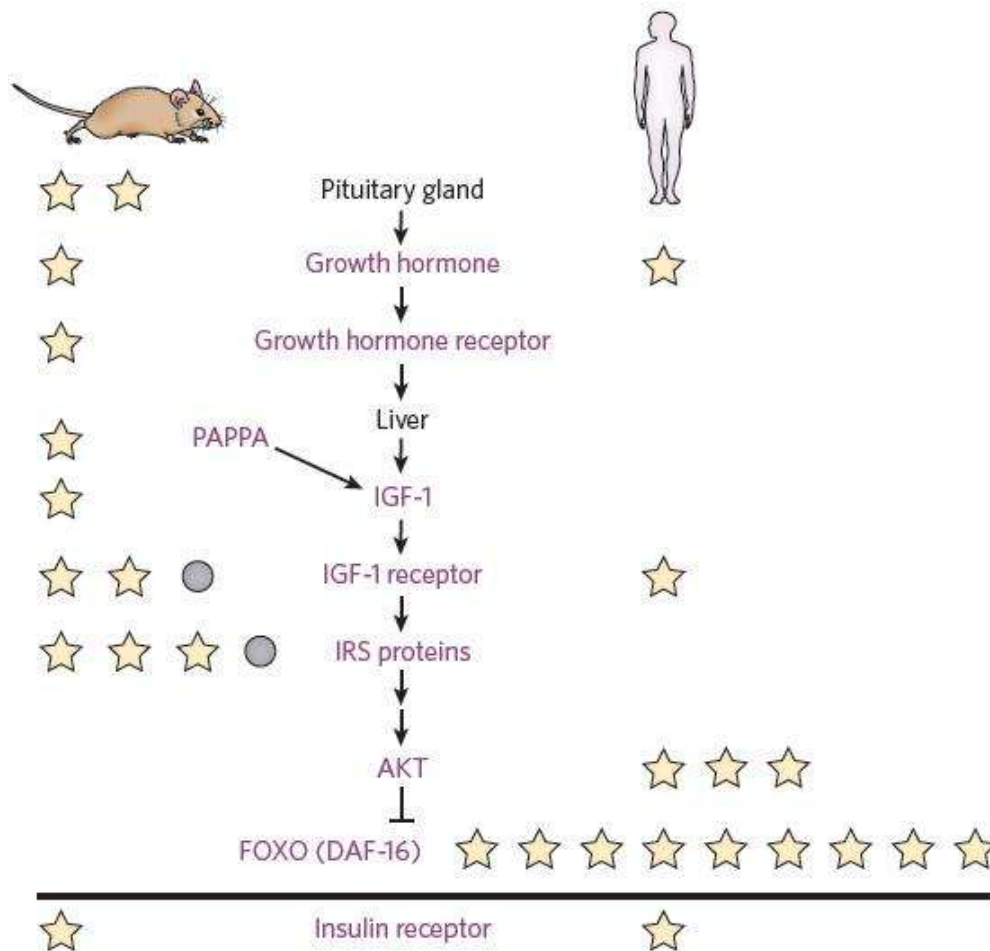


Figure 7 - Insulin/IGF-1 et signalisation FOXO affecte la durée de vie chez la souris et chez l'homme (Kenyon, 2010)

Chez la souris et chez l'homme, l'IGF-1 plasmatique est produite par le foie en réponse à l'hormone de croissance sécrétée par l'hypophyse. PAPP-A (protéine plasmatique associée à la grossesse), une métallo protéinase maintient les taux d'IGF-1 disponibles. L'inactivation de PAPP-A réduit la signalisation d'IGF-1. En réponse à IGF-1, son récepteur active une voie de signalisation en aval comprenant de nombreuses protéines qui ont un rôle dans la longévité.

Chaque étoile représente une lignée de souris mutante à longue vie ou une cohorte humaine dans laquelle les variants sont associés à une exceptionnelle longévité.

Les cercles représentent les études dans lesquelles des mutations observées n'ont pas pu être associées à une augmentation de la durée de vie

Chez la drosophile, l'inhibition de cette voie augmente l'activité de FOXO (orthologue de DAF 16 chez la drosophile) spécifiquement dans le tissu adipeux (Mair, 2003). Chez la souris, une forte corrélation négative a pu être montrée entre les taux d'IGF-1 et la régulation de la durée de vie dans des lignées de souris, signant l'implication d'IGF-1 dans la régulation de la durée de vie. De plus, des mutations qui inhibent le récepteur à l'insuline (spécifiquement dans le tissu adipeux), le récepteur IGF-1, et aussi des régulateurs en amont et en aval, peuvent aussi accroître la durée de vie.

Remarque : Cela n'a pas pu être montré pour certains gènes dans toutes les études.

De même, les petits chiens, avec une mutation qui diminue les taux d'IGF-1, vivent plus longtemps que les gros chiens.

Remarque : Chez la drosophile et la souris, les effets de la voie de l'insuline/IGF-1 sur la taille du corps ne sont pas corrélés. Et, au moins chez le nématode et la drosophile, cette voie agit sur la durée de vie chez l'adulte, après que la croissance a eu lieu.

Il peut paraître surprenant que des mutations de cette voie aient pour conséquence un allongement de la durée de vie alors que ces voies sont essentielles chez tous les animaux. En fait, la mutation du gène (*knout out*) qui code pour le récepteur à l'insuline dans le foie est responsable des diabètes chez la souris. Ainsi, le type précis de perturbation dans la voie peut avoir des conséquences importantes. Les animaux avec une longue durée de vie, présentant des mutations dans certains de leurs gènes au niveau de cette voie, sont sensibles à l'insuline alors que des mutations dans d'autres gènes provoquent une résistance à l'insuline (une caractéristique des diabètes de type 2). Il est probable que, pendant la période où une mutation induit une diminution de la voie de l'insuline /IGF-1, on assiste en aval à l'activation de DAF16/FOXO, permettant la maintenance cellulaire en garantissant l'homéostasie tissulaire et l'extension de la durée de vie de l'animal (Kenyon, 2010).

Chez l'homme, il semblerait aussi qu'une perturbation de la voie de l'insuline et d'IGF-1 puisse conduire à une augmentation de la durée de vie. En effet, les mutations connues conduisant à l'altération fonctionnelle du récepteur IGF-1 sont surexprimées dans une cohorte centenaire de Juifs askhénases (Suh, 2008). Les variants du gène du récepteur à l'insuline sont liés à la longévité dans une cohorte de Japonais (Kojima, 2004). Des variants d'AKT et de FOXO3A sont aussi corrélés à la longévité dans trois et sept cohortes respectivement (Pawlikowska, 2009). Les cohortes FOXO3A sont localisées à travers le monde : Hawaïens de descendants japonais (Willcox, 2008), Italiens (Anselmi, 2009), Askhénases, Allemands (Flachsbart, 2009) et Chinois (Li, 2009). Des variants de gènes de FOXO1 ont été aussi liés à la longévité dans des cohortes américaines et chinoises (Li, 2009 and Lunetta, 2007). Cette étonnante corrélation de protéines FOXO avec la longévité est -peut être- due à leur implication dans de nombreuses voies qui affectent la durée de vie.

Paradoxalement, les taux de GH et IGF-1 diminuent avec le vieillissement chronologique ainsi que dans des modèles de souris d'âge prématuré (Schumacher, 2008). Ainsi, une diminution de l'activité IIS (Insulin/ IGF signaling cascade) est une caractéristique commune au vieillissement physiologique et accéléré alors que qu'une diminution constitutive d'ISS rallonge la durée de vie. Ces observations, apparemment contradictoires, suggèrent que la régulation négative d'ISS est le reflet d'une réponse de défense dont le but est de réduire la croissance cellulaire et le métabolisme dans un contexte de dommage systémique (Garinis, 2008). Si cette hypothèse est vraie, les organismes présentant une baisse constitutive d'ISS peuvent vivre plus longtemps, puisqu'ils ont des taux de renouvellement cellulaires plus bas, un métabolisme plus lent, et qu'ils génèrent de moindres dommages cellulaires.

Remarque : Ces réponses de défense pour lutter contre le vieillissement pourraient aussi devenir délétères, comme cela a été montré par exemple chez les souris KO (PI3K ou AKT) chez lesquelles les embryons ne sont pas viables (Renner et Carnero, 2009). De même, il existe des souris atteintes de progéria avec un taux faible d'IGF-1, chez lesquelles une supplémentation en IGF-1 peut améliorer leur condition (Marino, 2010).

A côté de la voie ISS senseur du glucose, le système mTOR intervient comme un senseur des hautes concentrations en acides aminés et des nutriments stimulant la croissance et bloquant l'autophagie quand la nourriture est abondante.

1.2.1.1.2 Signalisation de mTOR

La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est une kinase conservée au cours de l'évolution ; elle existe sous la forme de deux complexes : mTORC1 et mTORC2. Alors que mTORC2 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette, mTORC1 régule la croissance et la durée de vie. mTORC1 active la protéine kinase S6 kinase (S6K) et inhibe, chez les eucaryotes, 4EBP1 (régulateur négatif de la traduction) pour stimuler la traduction et la croissance cellulaire (Figure 5).

L'inhibition de mTOR par la restriction calorique, par un traitement à la rapamycine ou encore par des manipulations génétiques, conduit à un rallongement de la durée de vie, de la levure à la souris (Kaeberlein, 2005 ; Kapahi, 2004 ; Vellai, 2003 ; Harrison, 2009).

Comme pour la voie de l'insuline/IGF-1, l'inhibition de mTOR nécessite des facteurs de transcription pour rallonger la vie, au moins chez le ver nématode (facteur de transcription PHA-4/FOXA) (Sheaffer, 2008) et chez la levure (Medvedik, 2007). Chez *C. elegans* et la drosophile, l'inhibition de mTOR stimule l'autophagie qui, chez les mutants IGF-1, est nécessaire pour l'augmentation de la durée de vie (Hansen, 2007; Bjedov, 2010). Il se pourrait que la stimulation de l'autophagie par l'inhibition de mTOR soit indirecte via l'activation de facteurs de transcriptions tels que PHA-4/FOXA chez le ver nématode (Hansen, 2013).

De même, l'inhibition de la kinase S6K augmente la durée de vie chez *C. elegans* (Hansen, 2007), la drosophile (Kapahi, 2004) et la souris (Selman, 2009).

Remarque : Bien que l'inhibition de l'activité mTOR montre clairement des effets bénéfiques sur l'âge, elle a aussi des effets indésirables. Par exemple, chez la souris, cette inhibition est associée à certaines pathologies liées à l'âge telles que, notamment, la résistance à l'insuline, les cataractes, le déclin immunologique, les défauts de cicatrisation et le dysfonctionnement moteur (Sahin et DePinho, 2012). Il sera donc important de déterminer les mécanismes impliqués dans les effets positifs et négatifs de l'inhibition de mTOR afin de voir s'ils peuvent être dissociés les uns des autres.

Parmi les voies sensibles aux nutriments, mTOR semble être celle qui est la plus liée à la restriction calorique (**Figure 8**). L'inhibition de mTOR mime les effets de la RC chez la levure, le ver nématode et la drosophile, car l'extension de la durée de vie provoquée par l'inhibition de mTOR n'est pas augmentée par une RC additionnelle (Hansen, 2007 ; Kapahi, 2004 ; Bjedov, 2010).

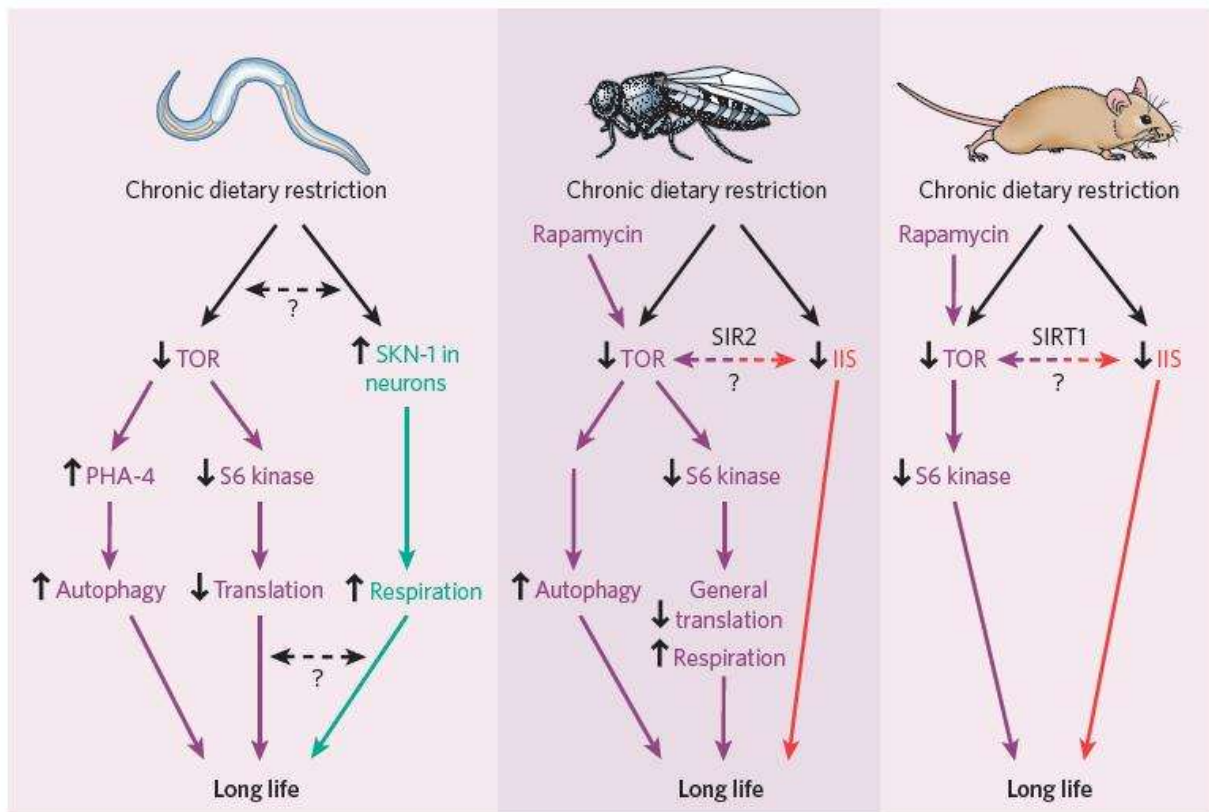


Figure 8 - Les voies qui influencent le rallongement de la durée de vie (Kenyon, 2010)

1.2.1.1.3 AMP kinase

Par ailleurs, l'allongement de la durée de vie chez la souris SK6 déficiente semble être médiée par l'activation de l'AMP protéine kinase (AMPK), qui joue un rôle de senseur central dans l'homéostasie énergétique. L'AMPK, activée par une augmentation du ratio AMP/ATP, bloque les voies anaboliques à travers l'inhibition indirecte de mTOR1 et active les voies cataboliques pour générer de l'ATP. L'AMPK augmente les niveaux d'ATP en stimulant la biogénèse et la fonction mitochondriale de même que l'oxydation des acides gras. L'activation de l'AMPK chez la souris traitée à la metformine (un antidiabétique) augmente la durée de vie (Anisimov, 2008) et la délétion de l'orthologue de l'AMPK *aak-2* chez *C. elegans* abroge l'extension de la durée de vie chez les mutants *daf-2*. L'ensemble de ces données confirme que les voies de régulation de l'énergie et la préservation de la fonctionnalité de la mitochondrie sont des acteurs importants pour l'augmentation de la longévité (Sahin and DePinho, 2012).

L'AMP kinase est aussi nécessaire à l'extension de la durée de vie chez le ver nématode porteur des mutations *insulin/IGF1*, mais le mécanisme reste à élucider (Apfeld, 2004).

1.2.1.1.4 Sirtuines

Les sirtuines sont des protéines déacétylases NAD⁺ dépendantes, dont la surexpression a été associée au rallongement de la durée de vie chez la levure, *C.elegans* et la drosophile (Kenyon, 2005). Chez la levure, Sir2 favorise la ségrégation de protéines endommagées (par exemple, carbonylées) des cellules mères durant la division cellulaire (Liu, 2010). Une étude récente soutient que la chromatine (acétylation des histones) est une cible de Sir2 dans la régulation de la durée de vie chez la levure (Dang, 2009).

Chez *C. elegans*, une surexpression de Sir2 rallonge la durée de vie en activant DAF-16/FOXO (Kenyon, 2005). Il est fort probable que Sir 2 active directement DAF-16, par déacétylation, de même que chez les mammifères SIRT1 est connu pour déacétyler les protéines FOXO en réponse au stress oxydatif (Berdichevsky, 2006).

Remarque : Le Resvératrol, décrit comme un activateur de sirtuines, a montré un rallongement de la durée de vie des souris nourries avec un régime gras, mais pas chez celles soumises à un régime normal (Pearson, 2008). De plus, le Resvératrol ne rallonge pas non plus toujours la durée de vie chez la levure, C. elegans et la drosophile (Kaeberlein, 2007).

Chez l'homme, il n'a pas été démontré que la surexpression de sirtuines était associée à l'allongement de la durée de vie.

1.2.1.2 Dysfonctionnement des mitochondries

Parmi les nombreux axes de recherche pour comprendre les raisons du vieillissement, la théorie d'Harman, qui implique le stress oxydatif et les radicaux libres générés par les mitochondries, (Harman, 1965) est considérée comme un acteur principal du vieillissement, même si elle est controversée depuis les cinq dernières années (Lopez-Otin, 2013). Toutefois, étant à la fois une source majeure et potentiellement une première cible de ROS délétères, le dysfonctionnement de la mitochondrie est fortement associé au commencement des maladies liées à l'âge (Lagouge, 2013).

1.2.1.2.1 Métabolisme oxydatif ROS

Les sources des ROS (Reactive Oxygen Species) sont multiples : elles peuvent être endogènes, comme les mitochondries ou le peroxysome, aussi bien qu'exogènes, comme les ultraviolets (UV) (King, 2004), les radiations ionisantes (IR) (Krasnovsky, 2003), la lumière visible (Jou, 2004), les agents chimiothérapeutiques ou encore les xénobiotiques. En produisant l'énergie cellulaire sous forme d'ATP (via la phosphorylation oxydative OXPHOS) qui représente environ 90% de l'énergie cellulaire, la mitochondrie est le lieu principal de production de radicaux libres oxygénés dans une cellule qui doivent être détoxifiés. Cette énergie est produite au niveau de la chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne de la mitochondrie, composée de cinq complexes protéiques (complexes I-V) et deux 2 transporteurs d'électrons, le coenzyme Q et le cytochrome C. L'énergie métabolique résultant de la dégradation oxydative des glucides, lipides et protéines est utilisée pour la formation des coenzymes réduits (NADH) et des flavoprotéines réduites (FADH₂). La chaîne mitochondriale de transport des électrons oxyde ces coenzymes réduits et libère de l'énergie qui sert à la

synthèse d'ATP. L'oxydation de ces coenzymes s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de la chaîne de transport, sont ensuite transférés à l'oxygène moléculaire O_2 , accepteur terminal de la chaîne. L'oxygène subit alors une oxydation conduisant à la production d'eau, au niveau du complexe IV.

Cependant, il peut arriver qu'il y ait une fuite d'une certaine proportion d'électrons au niveau des chaînes de transport électronique, conduisant à une réduction incomplète de l'oxygène et à la formation de ROS. Décrits comme les principaux sites de production des ROS, les complexes I et III (Murphy, 2009) produisent des ions superoxyde O_2^- - toxiques (Wei, 1981). De récents travaux sur des cellules humaines ont permis aussi de mettre en évidence la contribution du complexe II dans la production de ROS (Aitken, 2007). Des enzymes, les superoxydes dismutases, catabolisent les ions superoxyde, en eau oxygénée H_2O_2 , elle-même catabolisée en eau par une autre enzyme mitochondriale : la glutathion peroxydase (GPX) (**Figure 9**). La réduction incomplète de l'oxygène peut aussi conduire, après la catabolisation en eau oxygénée, à la production de radicaux hydroxyles libres $\cdot OH$ par la réaction de Fenton.

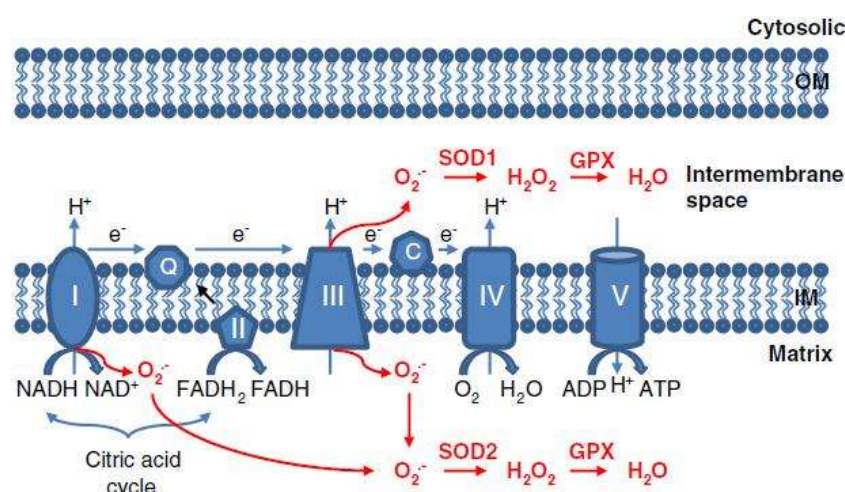


Figure 9 - Production et disposition des ROS mt (Li, 2013)

O_2^- et H_2O_2 - Enzymes de détoxification

OM: outer membrane; IM: inner membrane.

Cette production de ROS n'est pas nécessairement pathologique :

- Dans des conditions physiologiques normales, sans stress additionnel supplémentaire au niveau de la chaîne respiratoire, jusqu'à 5% de l'oxygène consommé par les mitochondries est converti en ROS. Cependant, ce taux provient d'expériences réalisées à partir de mitochondries isolées et il est fort probable que les mitochondries *in vivo* soient exposées à des concentrations d'oxygène plus faibles. Par conséquent, la conversion d' O_2 en ROS est aussi plus faible (Birch-Machin, 2010).

- Les ROS ont de nombreux rôles physiologiques, car ils sont d'importants régulateurs de la progression du cycle cellulaire, de la signalisation intracellulaire et de l'apoptose (Bratic et Larsson, 2013).

- De plus, en réponse au stress oxydatif (ROS), la mitochondrie met en œuvre de nombreuses adaptations fonctionnelles via la stimulation de ces systèmes anti-oxydants enzymatiques (Sharma, 2006) ou non enzymatiques. Ces systèmes transforment les ROS en des dérivés moins nocifs ou favorisent encore la stimulation de protéines chaperonnes (Green, 2014) qui empêchent le changement de conformation des protéines induit par les ROS ; ils permettent ainsi de rétablir l'homéostasie en réponse à un stress oxydatif modéré. Cet équilibre entre

production d'oxydants et antioxydants est essentiel pour prévenir le dysfonctionnement cellulaire.

Remarque : En baissant la production de ROS et en augmentant les défenses anti-oxydantes, on pouvait s'attendre à réduire les altérations liées à l'âge en allongeant éventuellement la durée de vie qui en découle.

Or, aucune corrélation claire n'a pu être mise en évidence entre la surexpression d'enzymes mitochondriales anti-oxydantes et la régulation de la durée de vie dans des modèles variés, tels que C. elegans, la drosophile, et la souris transgénique. Alors que certains rapports suggèrent l'amélioration des fonctions cellulaires grâce à des antioxydants chez des rongeurs (Bratic et Larsson, 2013), de nombreuses études d'intervention chez l'homme suggèrent qu'une supplémentation en anti-oxydants (vitamine E, bêta-carotène ou vitamine A) n'a pas de bénéfice dans la prévention des maladies liées à l'âge et pourrait même conduire à une augmentation de la mortalité (Bjelakovic, 2007 ; Bjelakovic, 2013).

Quant aux ROS, leur taux de production n'est pas non plus clairement corrélé avec la durée de vie spécifique aux espèces. Bien que certaines des comparaisons inter-espèces - palourdes, insectes, oiseaux et mammifères- suggèrent une corrélation positive entre la production de peroxyde d'hydrogène par les mitochondries et la longévité impliquant donc le taux de ROS comme un facteur déterminant dans la régulation de la durée de vie (Lambert, 2007 ; Ungvari, 2011), d'importantes exceptions ont jeté le doute sur ce postulat. Par exemple, le rat taupe, qui a la durée de vie la plus longue chez les rongeurs (durée de vie max de 25 à 30 ans), a des taux similaires de production de ROS à ceux de la souris (durée de vie max de 3 à 4 ans). De plus, le rat taupe ne montre pas non plus de variations en fonction de l'âge en termes d'expression d'enzymes anti-oxydantes (Andziak, 2005), alors que le taux de dommages oxydatifs augmente fortement avec l'âge (Andziak, 2006).

Enfin, les travaux chez le rat taupe sont en accord avec les récentes observations chez *C. elegans*, les mouches et la souris, montrant que l'augmentation des ROS pourrait prolonger la durée de vie chez *C.elegans*, la levure, la drosophile et la souris (Bratic et Larsson, 2013 ; Lopez-Otin, 2013).

Ces observations ont amené la communauté scientifique à reconsidérer le rôle des ROS au cours du vieillissement. Récemment, il a été montré que les ROS ont de nombreux rôles physiologiques, car ils sont d'importants régulateurs de la progression du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la signalisation intracellulaire (Bratic et Larsson, 2013). Ainsi, on peut considérer la production des ROS comme un signal de survie en réponse à un stress provoqué qui va entraîner l'activation de signaux compensatoires pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Sena et Chandel, 2012). A côté de cette production normale, l'accumulation des dommages macromoléculaires perturbe l'ensemble du métabolisme cellulaire et l'intégrité du matériel génétique, deux stimuli clés du vieillissement (**Figure 10**).

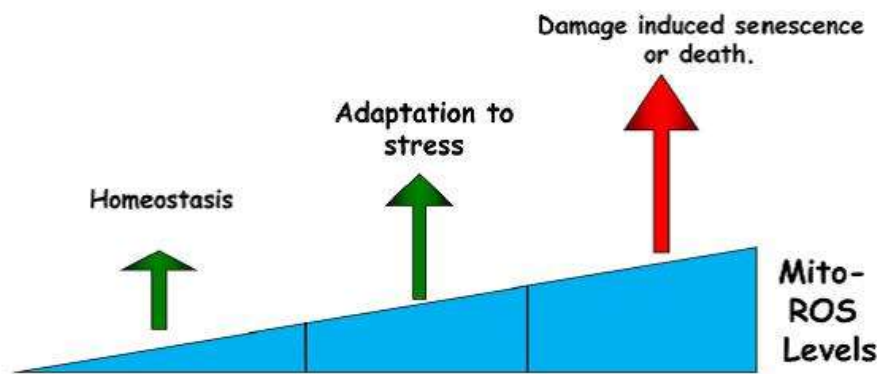


Figure 10 - Le taux de ROS détermine les conséquences sur la physiologie cellulaire (Sena and Chandel, 2012).

Les ROS sont connus pour endommager les protéines, les membranes et l'ADN par oxydation. Comme l'ADN mitochondrial (ADNmt) se situe à proximité de la génération des ROS, il est probable qu'il soit endommagé par ces espèces réactives (**Figure 11**).

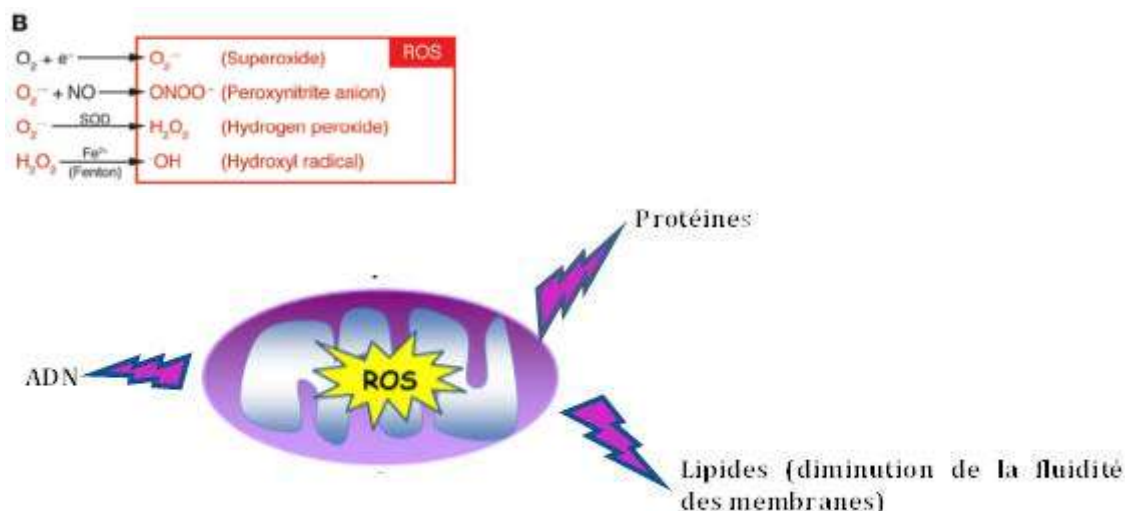


Figure 11 - Cibles des espèces réactives produites par la mitochondrie (Bratic et Larsson, 2013)

Par exemple, bien que le radical hydroxyl ait une durée de vie très courte, de l'ordre de 1ns ou moins, il reste l'un des ROS les plus agressifs pouvant interagir avec les bases de l'ADN. 8-Oxo-guanine (8oxoG) et 8-oxo-adénine sont les produits d'oxydation de l'ADN les mieux caractérisés, notamment 8-oxoG qui est hautement mutagénique : défauts d'appariement avec l'adénosine conduisant à des substitutions G→T et C→A (Cooke, 2003). Par ailleurs, au fur et à mesure de leur réplication, les génomes mitochondriaux peuvent accumuler des mutations pouvant compromettre éventuellement l'efficacité de la phosphorylation oxydative (Wallace, 2001). Ensemble, la déficience dans leur fonctionnement et/ou l'excès des espèces réactives oxygénées constituent des stimuli clés du vieillissement. Comme l'intégrité de l'ADNmt est essentielle au fonctionnement de la chaîne respiratoire (car il code pour une partie de leurs sous-unités), l'accumulation de mutations pourrait contribuer au vieillissement

et à la mort cellulaire par apoptose. Le dysfonctionnement des mitochondries conduit à la génération de plus de ROS et à une boucle rétroactive, aboutissant à un mécanisme de « cercle vicieux » initialement proposé par Harman (Harman, 1992) et fondé sur plusieurs observations (**Figure 12**): i) la production de ROS mitochondriaux augmente avec l'âge, ii) l'activité des enzymes de détoxification diminue avec l'âge et, iii) des mutations de l'ADNmt augmentent avec l'âge.

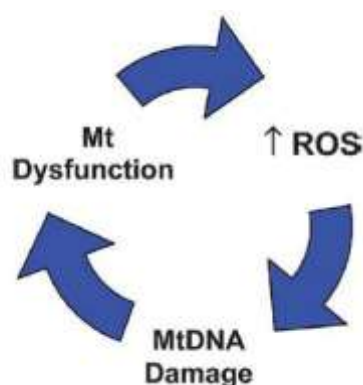


Figure 12 - L'accumulation de mutations de ADNmt est une conséquence de la production de ROS responsable du vieillissement (Birch-Machin, 2009)

Remarque : Le postulat d'Harman sur le rôle direct de la fonctionnalité de l'ADNmt dans le vieillissement est très débattu si l'on considère l'ADNmt en fonction de l'espèce.

Par exemple, la plus fréquente des mutations rapportées dans différentes espèces est la délétion commune (4977BP) mais sa pertinence est controversée (Birch-Machin, 1998).

Par ailleurs, des travaux récents, notamment sur la souris mutator, ont montré que l'accumulation des mutations de l'ADN mitochondrial avec l'âge n'était pas associée à une augmentation de la production de ROS et des dommages oxydatifs, quand bien même sa capacité de phosphorylation oxydative était sévèrement altérée. Dans ces travaux, l'accumulation de mutations était corrélée à l'induction de marqueurs d'apoptose. Là encore, ces résultats remettent en question le concept du cercle vicieux d'Harman (Kujoth, 2005).

En bref, si le postulat d'Harman était correct, l'augmentation de la capacité anti-oxydante devrait conduire à un allongement de la durée de vie. Or, depuis bientôt deux décennies, il n'y a pas de consensus sur ce postulat, avec à l'appui de nombreuses revues suggérant que les ROS sont aussi bien délétères que bénéfiques dans l'augmentation de la durée de vie des organismes (Hekimi, 2011).

L'équilibre entre le potentiel élevé des effets délétères des ROS et de leurs possibles effets bénéfiques est étroitement connecté au concept de l'hormesis. Selon ce concept, les traitements à des doses faibles ont des effets bénéfiques, alors que des doses élevées ont des effets délétères. Ainsi, les ROS peuvent être considérés comme des agents « hormétiques », car ils activent des réponses adaptatives en aval qui conduisent à une augmentation de la résistance au stress oxydatif, à la protection neuronale et la longévité (Mao et Franke, 2013).

Mao et Franke proposent un modèle mathématique simulant une réponse adaptative bi-phasique de l'effet des concentrations des ROS versus la durée de vie (**Figure 13**) (Mao et Franke, 2013). En accord avec ce modèle de prédiction, une étude portant sur les kératinocytes humains âgés, la dose de 60 μ M de peroxyde d'hydrogène a montré des effets bénéfiques sur le maintien de la longueur des télomères (Yokoo, 2004).

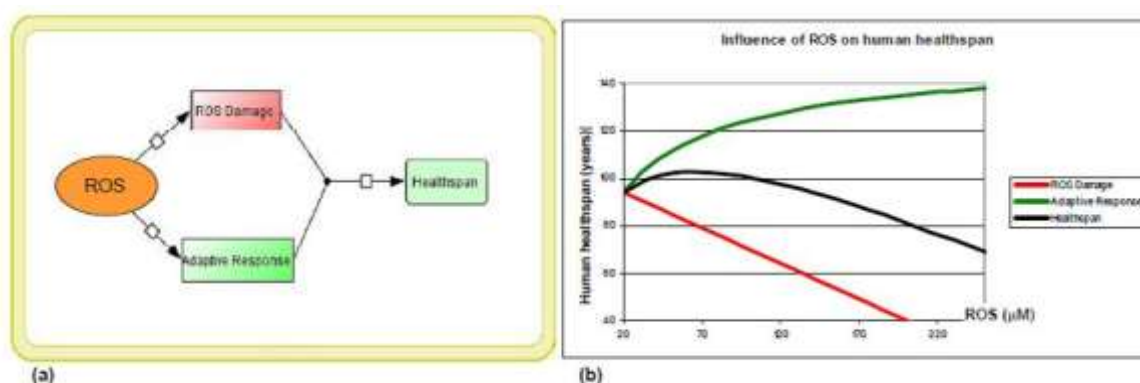


Figure 13 - Modélisation de l'hormesis induit par les ROS (Mao, 2013)

Une connaissance plus approfondie des mécanismes biologiques qui expliquent cette réponse bi-phasique en fonction de la dose sera nécessaire dans l'utilisation de stratégies thérapeutiques pour le rallongement de la durée de vie. Une des clés de la réussite des futurs traitements reposant sur les principes de l'hormèse consistera à cibler la bonne dose dans la « fenêtre hormétique » (Calabrese, 2010) en intégrant l'espace homéodynamique de chaque individu, i.e par l'intégration des interactions des réseaux génétique et épigénétique qui sont uniques à chacun.

Aujourd'hui, on a montré que des composés comme la metformine et le Resvératrol peuvent induire un faible taux d'énergie caractérisé par une augmentation des taux d'AMP (adénosine monophosphate) et une activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase). Chez *C. elegans*, la metformine est capable de rallonger la durée de vie via l'induction de l'AMPK, régulateur de l'homéostasie énergétique, (Hardie, 2014) et de Nrf2, voie de signalisation principale des antioxydants endogènes (Boutten 2011).

Indépendamment de l'action directe des ROS, d'autres altérations métaboliques et cellulaires contribuent aussi au processus du vieillissement en provoquant des changements secondaires au niveau de la production de l'énergie et au niveau de la biogénèse mitochondriale.

1.2.1.2.2 Altérations de l'intégrité des mitochondries et biogénèse

Plusieurs mécanismes convergents expliquent la réduction de l'efficacité bioénergétique avec le vieillissement.

1.2.1.2.2.1 Le métabolisme mitochondrial

De nombreux mécanismes semblent impliqués dans **les voies métaboliques qui régulent la durée de vie**. Parmi eux, **la fonction mitochondriale et les défenses anti-oxydantes sont considérées comme d'importants modulateurs de la durée de vie**.

Les voies de signalisation, insuline (Insulin/ IGF-1 signaling « IIS ») et **mTOR** (Holzenberger, 2003 ; Choi, 2011), en modulant le métabolisme mitochondrial, se révèlent importantes pour **la médiation de la longévité**. [Voir paragraphe « deregulating Nutrient Sensing »](#).

Des auteurs ont ainsi proposé un modèle décrivant, d'une part les effets qui sont dus à un dysfonctionnement de la voie IIS, et, d'autre part ceux qui sont dus aux effets de la restriction calorique (RC) sur la fonction mitochondriale et le vieillissement. Dans ce modèle, une altération dans la voie de signalisation conduit à une diminution de la disponibilité du glucose cellulaire, avec pour conséquence une augmentation cellulaire du ratio AMP/ATP, ce dernier activant à son tour l'AMPK. Puis, l'AMPK active PGC-1 α (peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α), le métabolisme mitochondrial et le taux de respiration qui a pour résultat une production transitoire de ROS. Cette dernière stimule l'expression des enzymes de détoxification (i.e catalase, SOD) aboutissant à la diminution des ROS et à l'augmentation de la résistance au stress et de la longévité (Bratic et Larsson, 2013) (**Figure 14**).

Une diminution de la voie IGF1 [« Voir paragraphe « deregulating Nutrient Sensing »](#) est associée à une amélioration de la fonction mitochondriale, comme cela a été démontré chez la souris Ames à longue durée de vie (elle a de très faibles taux d'IGF1) et chez la souris présentant une diminution du taux de protéines substrats IRS2 (insulin receptor substrates) (Sadagurski, 2011 ; Brown-Borg, 2011). La diminution de la voie de signalisation de l'insuline (Insulin/ IGF-1 signaling « IIS ») provoque une augmentation des facteurs de transcription FOXO, lesquels induisent l'expression d'enzymes antioxydantes, telles que la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) et la catalase. Par voie de conséquence, des souris déficientes en FOXO présentent des taux élevés en ROS et une déplétion en cellules souches (Tothova, 2007).

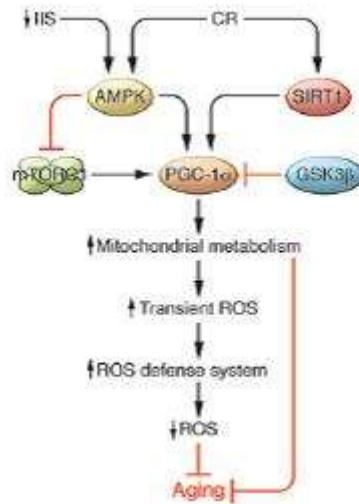


Figure 14 - Modèle des effets dus au dysfonctionnement de la voie ISS et RC (Bratic et Larsson, 2013)

Par ailleurs, les effets de la RC sur la longévité concernent de nombreux organes et différentes voies métaboliques. Là encore, il a été suggéré que l'effet positif de la RC sur l'incidence de maladies cardiovasculaires chez l'animal pourrait être dû à une normalisation de la biogénèse mitochondriale, à une atténuation de la production de ROS et, en conséquence, à une inhibition des voies de signalisation régulées par les dérivés mitochondriaux des ROS (e.g. NF-KB) (Dai, 2012). Cela a été montré à la fois chez la souris de type sauvage et chez la souris mutator (variant avec ADN mitochondrial déficient en ADN polymérase- γ , présentant un vieillissement précoce avec une durée de vie courte). Cette souris, soumise à un exercice continu, peut « échapper » au phénotype de vieillissement précoce, ce qui souligne l'importance de la biogénèse des mitochondries et de leur renouvellement pour ralentir le vieillissement (Sadfar, 2011).

Chez la drosophile, Zid et al. ont montré qu'une diminution de l'activité mTOR au cours de la restriction calorique était associée aussi à une amélioration de la fonction mitochondriale, via la régulation de l'expression de gènes des composés de la chaîne respiratoire et via 4E-BP (Eukaryote initiation factor eIF4E binding protein), une protéine phosphorylée par mTOR qui régule la traduction des RNA et la croissance chez la mouche et les mammifères (Zid, 2009).

On peut dire que les données actuelles suggèrent que les effets bénéfiques de la RC sur la longévité sont en partie dus à l'amélioration de la fonctionnalité des mitochondries.

Remarque : Bien que des études suggèrent que ces voies sont aussi pertinentes sur la durée de vie chez l'homme, les mécanismes restent encore à élucider (Ziv, 2011).

Sahin et DePinho proposent un « circuit » moléculaire reliant directement les dommages à l'ADN (raccourcissement, diminution de l'expression des gènes responsables de la stabilité et de la réparation de l'ADN) et l'altération de la biogénèse et de la fonction mitochondriale.

Le modèle de vieillissement (modèle mitochondrial télomère-p53) dans lequel l'ADN endommagé active p53 permet d'établir une connexion entre les dommages de l'ADNmt et le dysfonctionnement mitochondrial par le biais de la suppression de régulateurs clés dans la biogénèse et la fonctionnalité de la mitochondrie, PGC1 α et PGC1 β (PGC-1 related estrogen receptor coactivator) (Sahin et De Pinho, 2012).

Ce modèle de vieillissement pourrait expliquer, d'un côté le lent et progressif déclin, et de l'autre la nature précipitée du vieillissement (**Figure 15**). Ce modèle permet de mieux comprendre comment différentes voies s'entrecroisent et convergent finalement vers la mitochondrie.

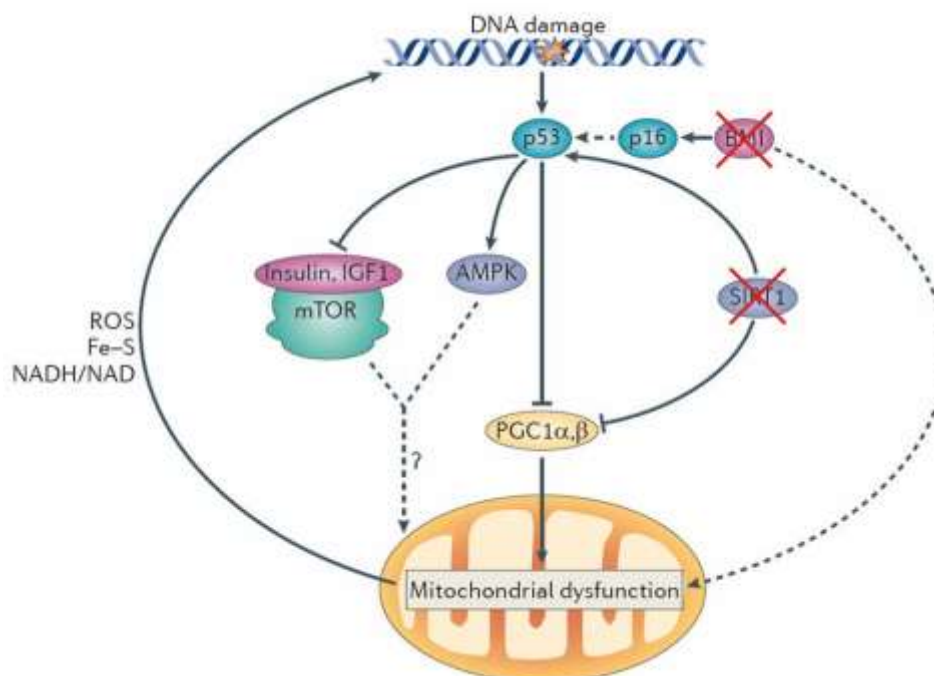


Figure 15 - Théorie de l'âge unifiée (Sahin et DePinho, 2012)

La boucle rétroactive du cycle générerait des ROS et d'autres dérivés mitochondriaux tels que le complexe Fe-S et NADH/NAD. Cette production de ROS génère un cycle délétère en favorisant l'augmentation des dommages génotoxiques, particulièrement au niveau des séquences télomériques riches en Guanine, suivie d'une activation soutenue de p53, puis un déclin mitochondrial, puis une génération de ROS encore plus importante, et ainsi de suite. Cette augmentation des taux de ROS altère aussi les composants cellulaires, tels que l'ADNmt qui alimente cette spirale de dommages en réprimant l'expression des gènes codant pour l'O₂PHOS. Dans des conditions de sévères dommages nucléaires ou de l'ADN mitochondrial, ce cycle pourrait être contourné et le phénotype de vieillissement prématuré pourrait être le résultat d'une augmentation de l'apoptose dans différents tissus, comme cela a été rapporté chez la souris mutator (forme mutante en ADN polymérase γ) (Trifunovic, 2004).

De plus, plusieurs études ont montré que la RC chez la souris et le rat augmentait la biogénèse mitochondriale et la respiration mitochondriale à travers l'activation de la dé-acétylase sirtuine 1 (SIRT 1) qui active en aval son effecteur, PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor), co-activateur de 1 α (PCG-1 α) (Rodgers, 2005). Inversement, chez la souris knockout, SIRT1 montre une large activation de p53 et une espérance de vie abrégée (Chen, 2003). Quant à la sirtuine 3 (SIRT 3), localisée dans la matrice mitochondriale, elle régule l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie par dé-acétylation réversible des enzymes métaboliques telles que l'acétyl CoA synthétase 2 chez la souris (Hirschey, 2010).

Hallows et al ont proposé un modèle de régulation chez les mammifères des acetyl-CoA synthétases (AceCSs) par les sirtuines 1 et 3. Les AceCSs sont inactivées par des acétyls

transférases qui acétylent un important résidu lysine. Dans le cytoplasme, SIRT1 catalyse la désacétylation d'AceCS1 sur la lysine 661 (souris). Dans la mitochondrie, SIRT3 catalyse la désacétylation d'AceCS2 sur le résidu Lysine-635 (souris). L'acétate libre, absorbé ou généré à partir des réactions cellulaires endogènes, est converti en acétyl CoA, qui peut être utilisé dans différentes voies métaboliques telles que la synthèse des acides gras dans le cytoplasme ou du cycle de l'acide tricarboxylique dans la mitochondrie (**Figure 17**) (Hallows, 2006).

De plus, SIRT3 cible de nombreuses autres enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique, telles que les composés de la chaîne respiratoire (**Figure 16 et Figure 18**) (Giralt et Villaroya, 2012) et pourrait directement contrôler la production de ROS par désacétylation de la MnSOD, enzyme de détoxification majeure de la mitochondrie (Qiu, 2010).

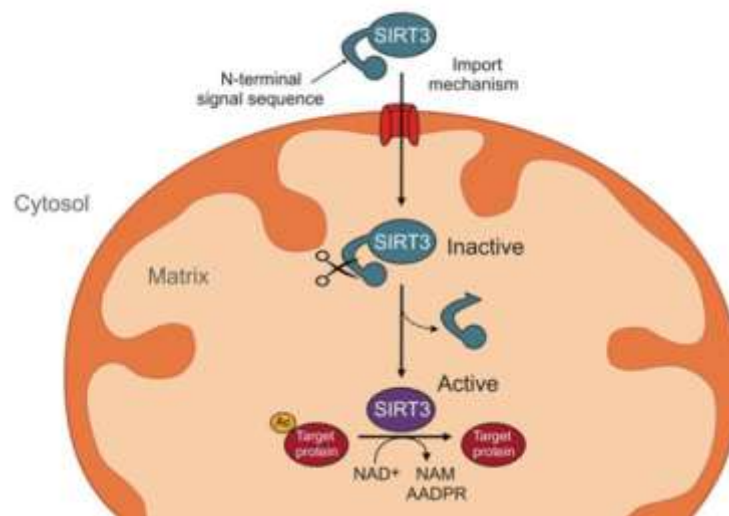


Figure 16 - SIRT3, dé-acétylase mitochondriale NAD⁺ dépendante (Giralt and Villaroya, 2012)

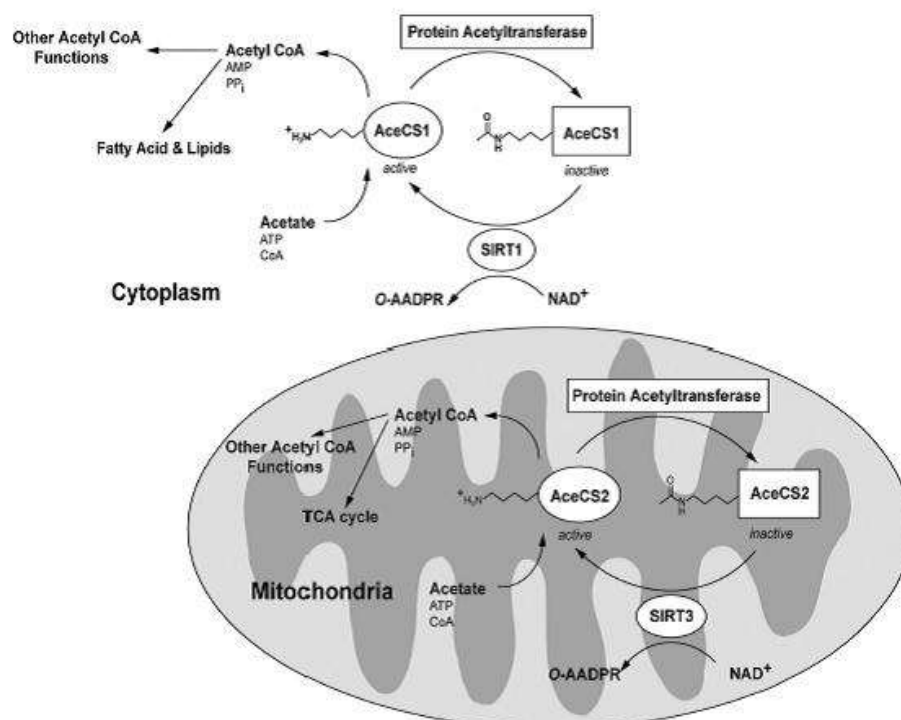


Figure 17 - SIRT3, dé-acétylase mitochondriale NAD⁺ dépendante (Hallows, 2006)

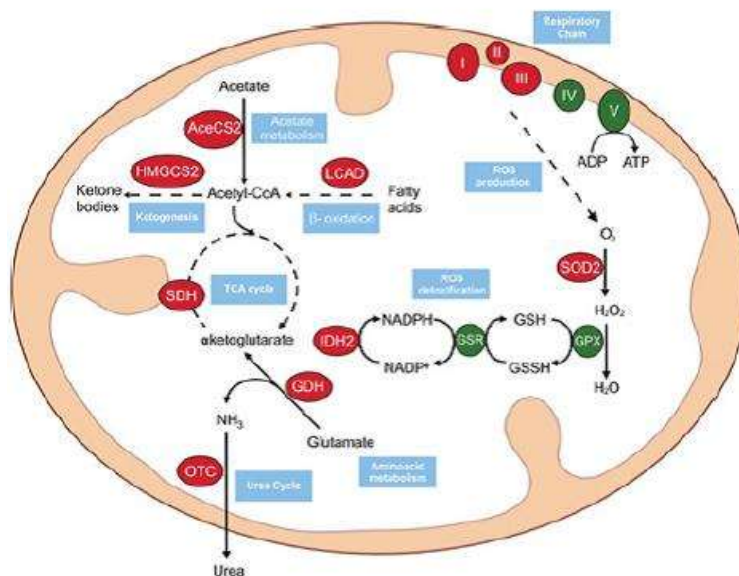


Figure 18 - SIRT3 régule de nombreuses voies métaboliques impliquées dans la production d'énergie, flux des substrats, production de ROS et détoxification (Giralt and Villaroya, 2012)

1.2.1.2.2.2 Mutation de l'ADNmt

L'ADN mitochondrial est une molécule circulaire double-brin de 16.559pb qui code exclusivement les protéines de la chaîne respiratoire. Il existe environ 4 à 10 copies par mitochondrie. Quant aux gènes nucléaires, ils codent environ pour 1500 protéines mitochondriales dont la majorité correspond à celles de la chaîne respiratoire, dont les 4 sous-unités du complexe II, mais aussi d'autres protéines comme celles impliquées dans la réplication, telles que la DNA pol γ (DNA polymerase γ) (Zapico et Ubelaker, 2013). Les gènes du génome mitochondrial sont très sensibles aux mutations et montrent une fréquence de mutation de l'ADNmt considérablement plus élevée que celle du génome nucléaire (Richter, 1995).

L'accumulation de divers types de délétion a été identifiée en fonction de l'âge au niveau de tissus variés chez différentes espèces, par exemple chez la souris et chez l'homme (Zhang, 1997). Parmi elles, la plus largement étudiée chez l'homme est la délétion 4977-pb, appelée aussi « délétion commune ».

Une large étude, conduite par Meissner et al, (Meissner, 2008), a montré une augmentation de la délétion commune avec l'âge dans le cerveau, le cœur et le muscle squelettique chez 92 sujets âgés de 2 à 102 ans.

Remarque : Meissner et al ont montré une grande variabilité inter-individuelle entre les sujets d'une même décennie et une variabilité intra-individuelle parmi les différents tissus d'un même individu. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études (Zhang, 1997 ; Corral-Debrinski, 1992).

Cette délétion inclut les gènes du complexe NADH déshydrogénase, cytochrome c oxydase et ATP synthétase, tous très importants pour la fonctionnalité de la mitochondrie. La délétion

commune est associée à des désordres congénitaux tels que le syndrome de Kearns-Sayre et la maladie d'Alzheimer (Berneburg, 2006).

Plus largement, les dommages de l'ADNmt pourraient conduire à un dysfonctionnement bioénergétique et, par conséquent, à un fonctionnement anormal de la fonction nerveuse. C'est le cas des maladies neurodégénératives qui sont associées à une perte progressive des neurones par apoptose et /ou nécrose (Druzhyna, 2008).

Les mutations somatiques de l'ADNmt s'accumulent dans les tissus post-mitotiques jusqu'à un certain seuil à partir duquel l'état énergétique des cellules est altéré ; c'est pour cette raison que la conséquence majeure des mutations de l'ADNmt conduit à un dysfonctionnement du métabolisme énergétique dans des tissus nécessitant de hauts niveaux d'énergie tels que le cœur, le muscle squelettique et le cerveau (Kujoth, 2007).

Une accumulation des mutations et délétions de l'ADN mitochondrial, qui correspondent à des défauts du métabolisme énergétique, ont été trouvées dans la maladie Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose amyotrophique latérale et la maladie de Huntingdon (**Tableau 2**) (Zapico et Ubelaker, 2013).

Au cours du vieillissement, l'accumulation de mutations de l'ADNmt (délétions, duplications et mutations ponctuelles) a été mise en évidence dans une grande variété de tissus, aussi bien chez l'homme que chez le singe et les rongeurs (Schwarze, 1995 ; Khaidakov, 2003).

Par exemple, chez la souris mutator (déficiente en polymérase γ mtADN), il a été montré une large variété de phénotypes liés à l'âge, tels que la cyphose (déformation de la colonne vertébrale), l'anémie, la perte des poils, l'alopecie, le blanchiment des poils et une durée de vie raccourcie. De plus, les données expérimentales suggèrent fortement que le grand nombre de points de mutations dans l'ADN mitochondrial de ces souris conduit à la synthèse de sous-unités de la chaîne respiratoire avec des substitutions d'acides aminés qui causent leur instabilité (Edgar, 2009).

Pour autant, il reste à déterminer si ces altérations sont une cause ou une conséquence du vieillissement (Hebert, 2010).

DISEASE	MUTATION
Parkinson	11778
	10398A
	PINK
	Parkin
	α -synuclein
Alzheimer	4977
	10398A
	T414G
	T477C
	Amyloid Precursor Proteins (APP)
Amyotrophic Lateral Sclerosis	Presenilin
	Cu/ZnSOD

Tableau 2 - Maladies neurodégénératives. Mutations en lien avec la fonction mitochondriale (Zapico and Ubelaker, 2013)

1.2.1.2.2.3 Dysfonctionnement des télomères

Récemment, Sahin et al (Sahin, 2012) ont montré un lien direct entre télomères et fonctionnement mitochondrial : un dysfonctionnement des télomères chez des souris transgéniques (déficientes en télomérase) conduit à l'activation de p53. A son tour, p53 exerce son rôle de supresseur en se liant aux récepteurs des promoteurs PGC1 α et PGC1 β , régulateurs-clés de la biogénèse et de la fonctionnalité des mitochondries. Les auteurs proposent un circuit moléculaire (**Figure 19**) qui lie directement les dommages de l'ADN au dysfonctionnement de la biogénèse et de la fonction mitochondriale conduisant au déclin des organes au cours du vieillissement. L'existence de cet axe est soutenu par des observations faites i) chez des patients atteints, par exemple, du syndrome de Werner (Muftuoglu, 2008) ii) chez des souris présentant un dysfonctionnement des télomères qui s'accompagne d'une altération des organes tels que les intestins, la peau et la moelle osseuse. Comme ces organes dépendent d'un renouvellement permanent qui est médié par les cellules souches résidentes et pro-génitrices, l'hypothèse proposée est celle d'une altération en amont des cellules souches provoquée par l'activation de p53 et l'induction de l'arrêt de la croissance, de la sénescence et de l'apoptose dans ces organes (Sharpless, 2004).

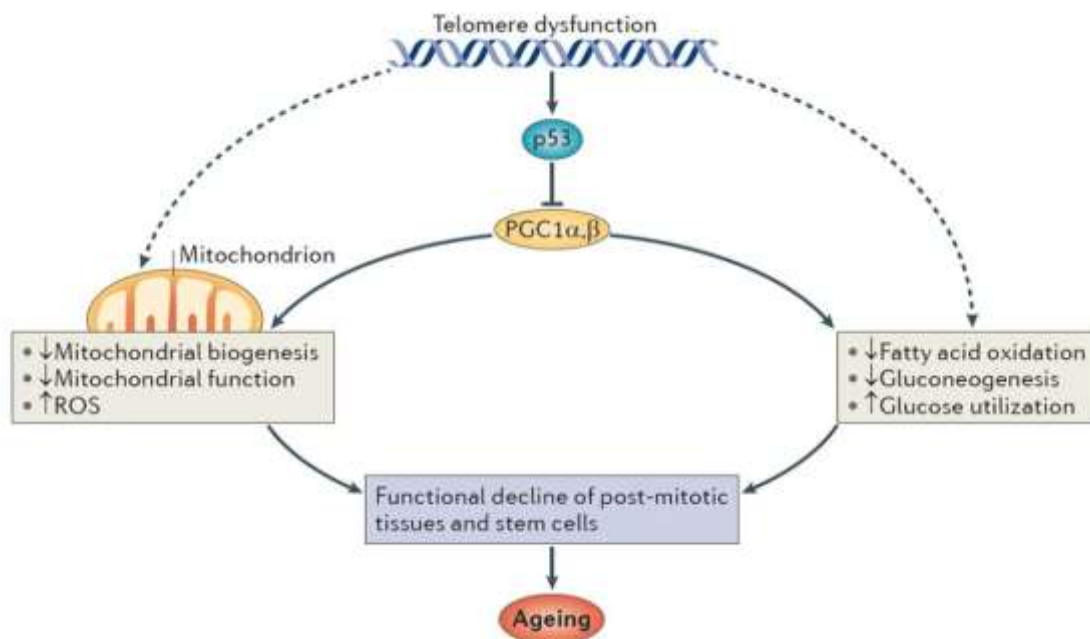


Figure 19 - Voie Télomère - p53-PCG (Sahin et DePinho, 2012)

La répression des 2 co-activateurs PGC-1 α et PGC-1 β s'accompagne d'une altération de la biogénèse et de la fonctionnalité des mitochondries qui conduit à un défaut de la production de l'ATP et à une augmentation des taux de ROS. Les PGCs sont impliqués dans le métabolisme énergétique régulant différentes voies comme l'oxydation des acides gras, la gluconéogenèse et l'assimilation du glucose. L'altération de la fonction des mitochondries et des autres voies moléculaires pourrait également conduire au déclin fonctionnel des cellules souches et des tissus post-mitotiques.

Si la production de ROS par la mitochondrie et l'accumulation des mutations de son ADN sont présumées très importantes dans le vieillissement, la dynamique membranaire des

mitochondries est aussi impliquée car elle est indispensable à la mitophagie ou à l'élimination sélective des mitochondries altérées, en lien direct avec l'autophagie.

1.2.1.2.2.4 Mitophagie, vieillissement et maladies neurodégénératives

Les mitochondries ont un rôle crucial dans la régulation de la mort cellulaire (Green, 2004). La mitophagie (processus autophagique des mitochondries) est déclenchée en réponse à des signaux pro-apoptotiques.

Les premières études qui ont mis en évidence l'importance du rôle de la mitophagie et du vieillissement cellulaire ont porté sur la levure. Ainsi, la délétion d'une protéine membranaire Uth1p (« youth 1P », protéine protectrice des dommages oxydatifs) a conduit à une altération de la mitophagie et à une diminution de l'espérance de vie chez la levure (Kissová, 2004).

Bien que chez *C. elegans*, le blocage de l'autophagie n'ait pas de conséquence sur la durée de vie, les vers portant la mutation daf-2 nécessitent que le processus d'autophagie soit intact pour permettre une durée de vie maximale (Meléndez, 2003).

Chez les cellules de mammifères, il a été rapporté de nombreuses altérations enzymatiques et morphologiques des mitochondries (Navarro et Boveris, 2004) dont l'accumulation doit contribuer pour une grande part au vieillissement et très certainement au développement de pathologies associées à l'âge. De plus, les protéines altérées peuvent se lier aux mitochondries et compromettre leur fonctionnement (Sun, 2009).

Le dysfonctionnement mitochondrial dû au stress oxydatif est considéré comme un élément majeur des maladies métaboliques comme le diabète, des maladies chroniques telles qu'Alzheimer ou Parkinson, car il conduit à une altération des fonctions cellulaires (Manczak, 2006). La majorité des maladies neurodégénératives affectant les hommes ont été reliées à des défauts de fonctionnement des mitochondries et du processus d'autophagie.

Par exemple, des mutations récessives identifiées au niveau des gènes PINK1 (Valente, 2004) et Parkin (Kitada, 1998) dans la maladie de Parkinson (la deuxième des maladies neurodégénératives chez l'homme au-delà de 50 ans) (Polymeropoulos, 1996) ont permis de révéler un nouveau mécanisme physiopathologique de la mitochondrie. Des études conduites à partir de lignées embryonnaires fibroblastiques de souris (PINK1- knock down) ont permis de montrer, en suivant la perte de fluorescence mitochondriale, que PINK1 était nécessaire à l'induction de la mitophagie (Narendra et al, 2010). Ainsi, lors d'un dysfonctionnement mitochondrial, PINK1 serait sélectivement stabilisé sur la membrane externe de la mitochondrie et recruterait Parkin pour stimuler la dégradation autophagique des mitochondries altérées via la poly-ubiquitination d'une cible protéique (non encore identifiée). La poly-ubiquitination stimule P62 et son domaine de liaison LC3 sur la membrane de l'autophagosome. Une fois dans l'autophagosome, la membrane de la mitochondrie peut être dégradée par les lysosomes au moment de la fusion lysosome- autophagosome (**Figure 20**). Lors d'une mutation de l'un ou l'autre gène, les membranes dépolarisées ne sont plus dégradées par ce processus contribuant à une caractéristique du dysfonctionnement observé dans cette pathologie.

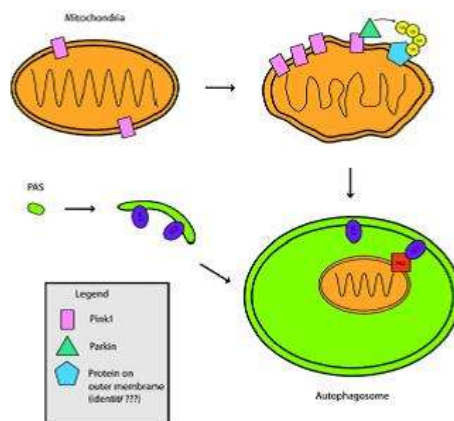


Figure 20 - PINK1 et Parkin interagissent pour recruter les mitochondries par les autophagosomes et promouvoir la mitophagie (Batlevi et La Spada, 2011).
PAS= Pre-Autophagosomal Structure

Remarque : D'autres auteurs suggèrent, à partir de cellules de neuroblastomes humains (SH-SY5Y), que le dysfonctionnement de PINK1 pourrait promouvoir un renouvellement excessif de mitochondries non endommagées (Dagda, 2009). De plus, il n'est pas certain que l'interaction Parkin et PINK1 soit la seule voie de l'autophagie. Plusieurs travaux réalisés chez les mammifères portant une mutation de PINK1 montrent que la mitophagie peut être stimulée par d'autres processus, tels que l'augmentation de la production de ROS ou l'augmentation de la fission mitochondriale (Figure 21) (Youle et Van der Bliek, 2012 ; Dagda, 2009 ; Wood-Kaczmar, 2008).

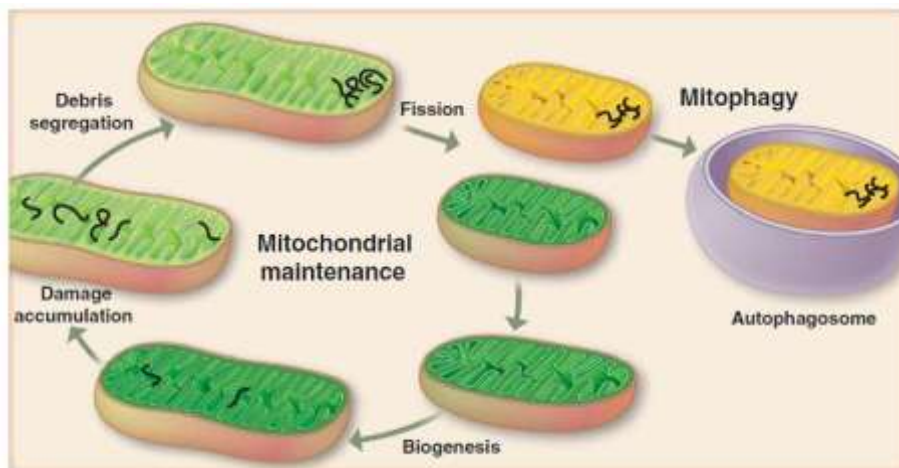


Figure 21- Elimination du pool de mitochondries par fission (Youle et Van der Bliek, 2012)

Si l'on considère la dynamique membranaire mitochondriale, l'inhibition de la fission mitochondriale, en empêchant le processus de mitophagie de se dérouler, peut conduire à une accumulation de mitochondries endommagées (Twig, 2008). De plus, il a été montré sur cellules humaines, que l'inhibition de la fission mitochondriale était associée à l'accumulation de mitochondries géantes et jouait un rôle dans l'induction de cellules sénescentes (Yoon, 2006).

Remarque : Cependant, d'autres travaux ont permis de montrer que la fission pouvait être liée au processus de mort des cellules neurales par apoptose, indiquant ainsi qu'un excès de fission est aussi délétère (Knott et Bossy-Wetze, 2008).

En résumé,

« Les ROS – ni trop, ni trop peu » pour le maintien de l'homéostasie

La mitochondrie, organisme indispensable à la vie aérobie, et à ce titre considérée comme la centrale énergétique de la cellule, est le lieu principal de production de radicaux libres oxygénés à des taux physiologiques indispensables dans la régulation de nombreuses voies de signalisation et de nombreux mécanismes pour garantir l'homéostasie tissulaire. A côté de cette production normale de ROS, un dérèglement de leur production, conduisant à l'accumulation de dommages oxydatifs, est responsable de nombreuses pathologies. De même, l'accumulation de mitochondries altérées participe au vieillissement et est associée à certaines pathologies.

A ce jour, les mécanismes qui pourraient réverser les ROS et le dysfonctionnement des mitochondries ne sont pas connus.

Comme pour la restriction calorique, où il est largement décrit que l'autophagie participe à l'augmentation de la durée de vie en inhibant la voie de signalisation Insulin/PIK3/TOR, l'élimination des mitochondries par mitophagie pourrait aussi contribuer à l'allongement de la durée de vie par ce même processus.

De façon intéressante, Rubinsztein a récemment proposé que l'endurance et un régime alterné pourraient en partie potentialiser les effets bénéfiques de l'autophagie sur le vieillissement (Rubinsztein, 2011). Cependant, l'autophagie n'est certainement pas le seul mécanisme à travers lequel un style de vie sain et équilibré pourrait retarder le vieillissement car de nombreuses voies additionnelles peuvent activer la longévité, comme l'a décrit Kenyon dans le cas de la restriction calorique stricte (Kenyon, 2010).

1.2.1.3 Instabilité génomique

Le maintien de la stabilité génomique est essentiel à la croissance et à la survie cellulaire. Cette stabilité dépend de la fidélité de la réplication de l'ADN, qui est un processus hautement régulé impliquant de nombreux facteurs protéiques et des points de restriction permettant à la cellule de repérer et de réparer les erreurs.

Récemment, Moskalev et al. ont émis le postulat que l'accumulation de dommages géniques était un des dénominateurs communs au cours du processus de vieillissement (Moskalev, 2013). Ces dommages peuvent être induits soit par des agents physiques exogènes, soit par des agents génotoxiques endogènes qui sont des produits du métabolisme, tels que les ROS ou encore par des réactions d'alkylation et/ou d'hydrolyse (**Figure 22**).



Quant aux syndromes de vieillissement prématuré accéléré qui constituent un groupe hétérogène de maladies rares, la plupart sont génétiquement déterminés et liés au défaut d'au moins un gène majeur ; cependant certains d'entre eux sont associés à un défaut de l'intégrité du génome et à des mécanismes défectueux de réparation de l'ADN. Ces derniers sont souvent caractérisés par une grande disposition à des tumeurs malignes-telles que les syndromes de Werner et Bloom (Burtner et Kennedy, 2010)-, alors que dans la Progeria d'autres mécanismes sont associés à un défaut de maturation de la Lamine A entraînant un dysfonctionnement de la matrice nucléaire avec un risque accru de diabète et de troubles vasculaires sans augmentation de la prédisposition au cancer.

A

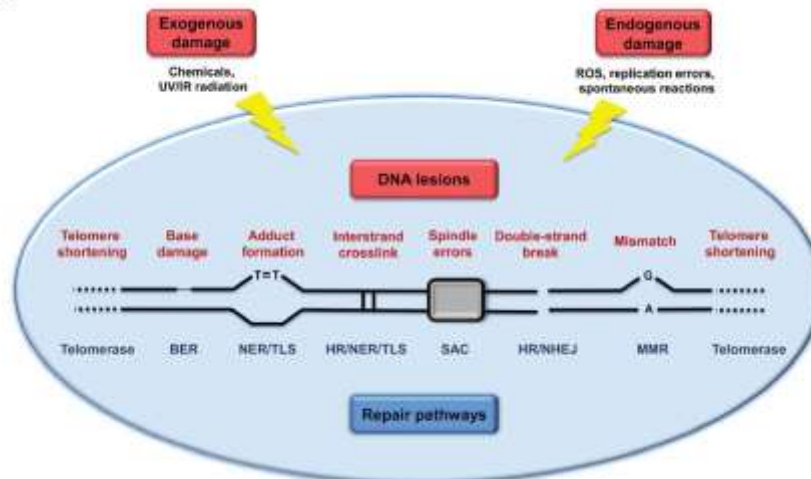


Figure 23 - Agents exogènes et endogènes pouvant entraîner un grand nombre de dommages de l'ADN (Lopez-Otin, 2013)

Age-related changes in DNA repair pathways.

DNA repair pathway	Age-related changes	Effects	Species/cells or organs	Reference
Direct reversal	Reduced activity of the O ⁶ -methylguanine DNA methyltransferase	Alkylation-related mutagenesis and carcinogenesis	Human brain	Silber et al. (1996)
BER	Deficiency of DNA polymerase β and DNA ligase	Increase in mismatched base pairs, modified bases, abasic sites, and oxidative DNA damage	Rat neurons	Krishna et al. (2005), Rao et al. (2000)
	Reduced 3-methyladenine DNA glycosylase activity	Accumulation of AP-sites	Human leukocytes	Atarashi et al. (2000)
	Decrease in 8-oxoguanine DNA glycosylase 1, AP endonuclease 1, and DNA polymerase γ expression	Accumulation of mtDNA mutations and age-related cataract pathogenesis	Rat lenses	Zhang et al. (2010)
	Reduced inducibility of DNA polymerase β and AP endonuclease in response to the DNA damage	Reduced BER and damage response	Mouse liver	Cabekof et al. (2006)
	Decreased abundance of DNA polymerase- β	Increased levels of DNA damage and mutagenesis	Mouse brain and liver, nuclear extracts	Iitano et al. (2001)
	Increased expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase and atag1 DNA glycosylase	Response to unrepaired oxidative DNA damage (?)	Human brain (cortex)	Lu et al. (2004)
NER	Decrease	Reduction in nucleotide excision of dimer photoproducts	Human fibroblasts and lymphocytes	Annett et al. (2004), Boyle et al. (2005), Grossman and Wei (1995), Kunkel et al. (1995), Moriwaki et al. (1996), Wei et al. (1993)
	Decrease	Reduction in nucleotide excision of dimer photoproducts	Rat fibroblasts and hepatocytes	Guo et al. (1998), Vigg et al. (1993)
Mismatch repair	Decrease	Increased microsatellite instability and accumulation of mutations involved in carcinogenesis	Human peripheral blood cells	Neri et al. (2005)
	Hypermethylation of hMLH1 promoter with inhibition of its expression	Spontaneous tumors with mismatch repair deficiency	Human normal colonic cells	Togata et al. (1999)
SSBR	Decrease	Increase in SSR and/or alkali-labile sites after X irradiation	Postmitotic cells from houseflies, <i>Musca domestica</i>	Newton et al. (1989a)
HR	Decrease	Increase in SSR and/or alkali-labile sites after X irradiation	Human lymphocytes	Singh et al. (1990)
SSA	Increase	Age-dependent shift from SSA and NHEJ to HR	Drosophila premeiotic germ cells	Preston et al. (2006)
SSA	Decrease	Age-dependent shift from SSA and NHEJ to HR	Drosophila premeiotic germ cells	Preston et al. (2006)
NHEJ	Decrease	Age-dependent shift from SSA and NHEJ to HR	Drosophila premeiotic germ cells	Preston et al. (2006)
	Decrease	Neuronal aging	Rat neurons	Vijayanti and Rao (2006)
	Decrease Ku70/80 levels, changes in Ku intracellular distribution, and the loss of appropriate response of Ku to DNA damage	NHEJ becomes less efficient and more error-prone; NHEJ in old cells was associated with extended deletions	Human fibroblasts	Schurakov et al. (2004, 2007)
	Decrease in Ku70/80 levels	Increased nuclear oxidative DNA damage and relatively higher susceptibility to aging	Rat testis	Um et al. (2001)
	Decrease in Ku70/80 DNA binding in response to X-ray	Decrease in X-ray induced DSB repair	Human peripheral blood mononuclear cells	Rocco et al. (1999)
	Decrease in Ku70 and Mre11 levels	Decrease in DSB repair and age-dependent telomere shortening	Human lymphocytes	Ja et al. (2006)
	Impaired Ku activity in testes, unaffected in liver. Altered expression in kidney and lungs	Increased expression of mtHSP70. Increase in the amount of nuclear oxidative DNA damage in the testes	Rat kidney, lungs, testes and liver	Um et al. (2001)

Tableau 3 - Systèmes de réparation dans différents modèles (Moskalev, 2013)

1.2.1.3.1 ADN nucléaire

Moskalev et al. ont montré qu'une large majorité des mutations somatiques s'accumulent avec l'âge chez les mammifères et chez l'homme (**Tableau 4**) (Moskalev, 2013). Ce phénomène s'étend à d'autres espèces telles que la levure (Wei, 2011) et la drosophile (Garcia, 2010).

Remarque: L'influence de l'étendue de cette accumulation sur les capacités fonctionnelles des cellules et des organes avec l'âge reste à élucider. De plus, certains dommages de l'ADN et certaines mutations ne s'accumulent pas avec l'âge, au moins dans certains organes, comme chez le rat (par exemple, les sites AP, larges sites de réarrangement dans le cerveau) (Tableau 4).

Enfin, le taux des mutations dépend largement de la régulation épigénétique. Voir paragraphe «épigénétique»

Type of DNA damage	Age-dependent alteration	Species/cells or organs	Reference
Formation of abasic sites: Apurinic/aprimidinic sites (AP-sites)	Increase Increase No change	Human leukocytes Rat liver Rat brain	Atamna et al. (2000) Atamna et al. (2000) Atamna et al. (2000)
DNA oxidation: 8-Oxoguanine (8-oxoG)	Increase Increase Increase Increase No change	Human neurons (gene promoters) Human skeletal muscles Rat and mouse liver, heart, brain, kidney, skeletal muscle, and spleen Rat liver, kidney, and intestine Rat brain and testes	Lu et al. (2004) Mecucci et al. (1999) Hamilton et al. (2001) Fraga et al. (1990) Fraga et al. (1990)
Thymine glycol (TG) 8-Hydroxyadenine (8-OHAd)	Increase Increase	Rat liver and lung Rat liver and lung	Wang et al. (1995) Wang et al. (1995)
DNA alkylation: O ⁶ -Methyldeoxyguanine (O ⁶ -medG) 7-Methylguanine (m7Gua)	No change Increase	Rat thymus, forestomach, and small intestine Rat liver	Mizoguchi et al. (1993) Park and Ames (1988)
DNA glycation: N ² -carboxyethyl-2'-deoxyguanosine (CEdG)	Increase	Mouse senescent embryonic fibroblasts NIH3T3	Breyer et al. (2011)
DNA cross-linkages: DNA-DNA crosslinks (DIDL) DNA-protein crosslinks (DPXL)	Increase Increase	Rabbit liver Mouse liver, brain, and heart	Yamamoto et al. (1988) Izzotti et al. (1999)
Indigenous DNA adducts (I-compounds): Deoxyguanosine malondialdehyde adduct (dG-MDA)	Increase	Rat liver, brain, and kidney	Draper et al. (1995), Cai et al. (1996)
DNA strand breaks: Single-strand breaks (SSB)	No change No change Increase	Mouse brain, liver, and kidney Human peripheral blood mononuclear cells Rat brain (max in cerebral cortex)	Fu et al. (1991) Trzeciak et al. (2012) Mandavilli and Rao (1996)
Double-strand breaks (DSB)	Increase	Rat brain (max in cerebral cortex and hippocampus)	Mandavilli and Rao (1996)

Tableau 4- Augmentation des dommages de l'ADN avec l'âge chez les mammifères (Moskalev, 2013)

D'autres formes de dommages de l'ADN, tels que l'aneuploïdie dans le cerveau humain, ont été aussi associés au vieillissement (Faggioli, 2011). Chez des souris transgéniques surexprimant BuR1 (point de contrôle de la division mitotique), il a été montré que cette kinase jouait un rôle protecteur contre l'aneuploïdie et le cancer, tout comme dans l'extension de la durée de vie (Baker, 2013).

Remarque : Des travaux sont encore nécessaires pour évaluer la pertinence fonctionnelle de l'aneuploïdie au cours du vieillissement, et de nombreuses questions biologiques importantes demeurent : est-ce que la fréquence de l'aneuploïdie est la même chez les jeunes adultes et les individus âgés, aussi bien chez la souris que chez l'homme ? Est-ce que la fréquence de l'aneuploïdie est la même pour chaque chromosome ? Ou alors la perte ou le gain d'un

chromosome spécifique représentent-ils un avantage ou un désavantage spécifique pour une cellule à l'âge adulte, etc.?

Enfin, il est à noter que, dans une grande variété de syndromes liés à l'âge, le compartiment des cellules souches est touché par les dommages de l'ADN. Par exemple, Rossi et al. ont montré, dans des modèles de souris au vieillissement prématuré, que les cellules souches hématopoïétiques étaient particulièrement sensibles au stress conduisant à une perte de leur capacité de reconstitution et de prolifération (Rossi, 2007). [Voir paragraphe « cellules souches ».](#)

A côté des dégâts de l'ADN nucléaire, l'accumulation de mutations ponctuelles ou de délétions de l'ADNmt au cours du vieillissement chez l'homme est aussi décrite depuis longtemps (Corral-Debrinski, 1992).

1.2.1.3.2 ADN mitochondrial

[Voir paragraphe « mutation ADNmt »](#)

Le vieillissement est associé à une expansion polyclonale des mutations de l'ADNmt aboutissant à de nombreux types de mutations d'ADNmt différentes à des taux faibles. En revanche, chez les patients atteints de syndromes mitochondriaux, on assiste à une expansion monoclonale avec des taux élevés d'un seul type de mutation de l'ADNmt (Park, 2010). Ces mutations sont « hétéroplastiques » car il existe des copies normales de l'ADNmt et quelques copies comportant ces mutations. Des points de mutations et délétions de l'ADNmt s'accumulent dans une grande variété de tissus chez la souris (Khaidakov, 2003), le singe (Schwarze, 1995) et l'homme (Corral-Debrinski, 1992).

L'hypothèse d'une relation entre ces mutations et le processus du vieillissement a naturellement été avancée. Cependant, ces mutations ne touchant qu'une très faible proportion de l'ADNmt total (0,01 à 0,1 %), leur responsabilité dans les processus de vieillissement est restée très controversée jusque dans les années 2000 (Lightowlers, 1999).

Depuis lors, quelques équipes, dont celle de Nils Larsson, ont fait progresser cette question en construisant une souris knock-in qui exprime une forme d'ADN polymérase mitochondriale (PolgA) mutée dans son domaine d'exonucléase mais sans modification de l'activité polymérase (Trifunovic, 2004). La PolgA est codée par un gène nucléaire, puis transportée dans la mitochondrie. Cette polymérase, spécifique de l'ADNmt, permet sa réplication et la correction des erreurs qui surviennent au cours de cette réplication. La forme mutée de PolgA permet donc une réplication normale mais ne corrige pas les erreurs de mutation (Rötig, 2004). Cette équipe a montré pour la première fois chez la souris mtDNA mutator une accumulation importante de mutations de l'ADNmt. Cette augmentation somatique était associée avec une diminution de la durée de vie et des signes de vieillissement précoce avec des caractéristiques très proches de celles que l'on observe chez l'homme (perte de poids, diminution de la graisse sous-cutanée, alopecie, diminution de la fertilité, ostéoporose...) (Trifunovic, 2004). De plus, le phénotype biochimique de la souris mutator renforce l'hypothèse selon laquelle les points de mutations de l'ADNmt créent des substitutions des acides aminés au niveau des sous-unités de la chaîne respiratoire, ce qui explique la diminution de la stabilité observée au niveau des complexes de la chaîne respiratoire (Edgar, 2009). De plus, la fonction des cellules souches de ces souris « progéroïdes » est particulièrement altérée (Ahlqvist, 2012), ce qui montre que le compartiment des cellules souches est sensible aux mutations de l'ADNmt. [Voir paragraphe « cellules souches »](#)

Il est généralement admis que des mutations somatiques de l'ADNmt sont causées par une accumulation des dommages au cours du vieillissement (Wallace, 2001). Cependant, Larsson propose une hypothèse alternative selon laquelle la plupart des mutations sont créées en tant qu'erreurs de réplication pendant l'embryogénèse, puis subiraient une expansion clonale au cours l'âge adulte (Larsson, 2010). En effet, il a été montré chez la souris mutator qu'une augmentation importante des points de mutations avait lieu durant l'embryogénèse. Toutefois, les signes de vieillissement n'étaient observés qu'à l'âge adulte et il n'y avait pas d'augmentation du stress oxydatif associé (Kujoth, 2005).

L'ensemble des résultats chez la souris mutator renforce l'hypothèse selon laquelle les mutations somatiques qui sont générées pendant l'embryogénèse pourraient contribuer au vieillissement à l'âge adulte.

Remarque : Des études montrant que la diminution des mutations de l'ADNmt pourrait augmenter la durée de vie sont nécessaires pour renforcer ces hypothèses chez la souris. Enfin, tous ces travaux ne permettent pas de conclure que ces mutations sont la cause du vieillissement chez l'homme.

1.2.1.3.3 Architecture nucléaire

La maintenance à long terme de l'architecture nucléaire est essentielle pour le fonctionnement des cellules et des tissus au cours de la vie. Le syndrome de Werner (WS), le syndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS) et l'ataxie télangiectasie sont des maladies génétiques rares de vieillissement précoce qui se caractérisent par des défauts de l'architecture nucléaire et des altérations de groupes de gènes indispensables pour le maintien de son intégrité.

WZ, maladie qui mime les effets du vieillissement normal incluant l'athérosclérose, le diabète et un vieillissement cutané important dès l'âge de 40 ans, se caractérise par un génome hautement instable à cause de l'altération fonctionnelle de la protéine RecQ hélicase (Yu, 1996).

HPGS, appelé Progeria, se caractérise par une mutation d'une simple base dans le gène LMNA qui code pour la Lamin A, qui est un composant structurel essentiel de la membrane nucléaire (Eriksson, 2003). La plupart des patients atteints de HGPS ont une mutation d'un seul nucléotide au niveau de l'exon 11 du gène codant la lamin A (LMNA), une protéine nucléaire qui a un processus complexe de maturation incluant la farnéylation et un processus protéolytique par la métalloprotéinase ZMPSTE24-FACE-1. Cette mutation aboutit finalement à une isoforme prelamin A, tronquée farnesylée, appelée progerin, qui s'accumule au niveau de la membrane nucléaire et altère de façon importante son architecture, conduisant à des signes cliniques qui ressemblent à ceux observés au cours du vieillissement normal chez l'homme : perte des cheveux, vieillissement accéléré de la peau (rides, diminution en épaisseur), athérosclérose...(Hennekam, 2006) et durée de vie écourtée (15 ans en moyenne) en raison de ce vieillissement prématuré (Varela, 2008).

Grâce à des techniques soit d'incorporations d'oligonucléotides en tant qu'inhibiteurs du site muté de LMNA, soit d'injections d'une combinaison de statines, ou encore d'inhibiteurs de farnesyltransferase, le lien de causalité entre les altérations de la Lamine A et le vieillissement prématuré a pu être établi à partir de modèles de souris HGPS qui ont montré un retard dans l'enclenchement du processus de vieillissement et un allongement de leur durée de vie alors

que leur taux de prelamin A ou progérine diminuait (Scaffidi et Misteli, 2006 ; Varela, 2008; Yang, 2005).

Scaffidi et Misteli (Scaffidi et Misteli, 2006) ont aussi détecté ce variant d'épissage tronqué (prelamin A) chez des humains âgés, ce qui renforce l'hypothèse de modifications de la lamine A dans le processus de vieillissement normal. De plus, HGPS et vieillissement chronologique « normal » partagent des voies de signalisation communes dont celle de l'activation de p53 (Varela, 2005).

L'hypothèse du rôle de la Lamine A dans le processus du vieillissement est renforcée par des données récentes obtenues à partir de cellules neuronales de *C. elegans* : chez les vers âgés, des changements de l'architecture nucléaire et une diminution de la durée de vie ont été mis en évidence (Haithcock, 2005).

L'exploration de la Progeria et des maladies apparentées du vieillissement s'inscrit dans une démarche de recherche translationnelle. L'exploration et l'identification des causes moléculaires de ces pathologies en tant que modèles de maladies extrêmement graves, a permis à la fois de comprendre certains des mécanismes associés au vieillissement naturel et d'identifier des pistes pour la compréhension et le traitement de ces pathologies chez des enfants atteints de ces maladies, par des inhibiteurs de farnésyltransférases (Lonafarnib) par exemple (Young, 2014) ou encore par des stratégies de recombinaisons homologues développées pour corriger les mutations de LMNA dans des cellules souches pluripotentes (iPSCs), dérivées de patients HGPS, qui ouvrent la voie à de futures thérapies cellulaires (Liu, 2011).

Remarque : Aucun des syndromes progéroïdes n'imité parfaitement ou complètement le vieillissement naturel. Certes, tous ces syndromes sont caractérisés par un vieillissement prématuré et accéléré mais ils restent segmentaires.

1.2.1.4 Raccourcissement des télomères

Séquences d'ADN répétitives (TTAGGG, chez tous les vertébrés) associées à un complexe protéique de six protéines (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, RAP1 et TPP1) appelé « complexe Shelterin » (connu aussi sous le nom de télosome), les télomères protègent l'extrémité de l'ADN de la réparation des dommages à l'ADN, de leur dégradation et de leur recombinaison (Chan, 2004 ; Palm et de Lange, 2008) (**Figure 24**). Ainsi, les marqueurs des dommages de l'ADN (DNA damage response en anglais ou DDR) au niveau des télomères s'accumulent et déclenchent une DDR persistante et la sénescence cellulaire (Fumagalli, 2012).

Les télomères sont générés par une reverse transcriptase appelée télomérase (télomérase reverse transcriptase ou Tert), une enzyme cellulaire capable d'ajouter des séquences d'ADN de novo aux extrémités 3'-OH des brins riches en Guanosine (Greider et Blackburn, 1985) (**Figure 25**).

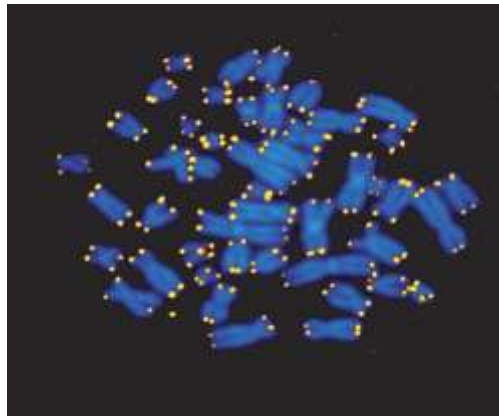


Figure 24 - Télomères de lymphocytes humains normaux sont visualisés par fluorescence quantitative - hybridation in situ (Aubert et Landsorp, 2008)

Télomères (jaune) et chromosomes (bleu)

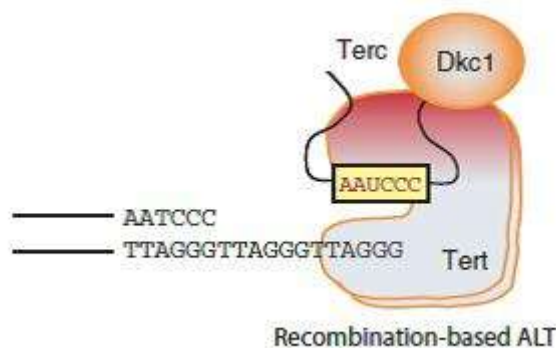


Figure 25 - Mécanisme d'élargissement des télomères (Blasco, 2007)

La télomérase est le principal mécanisme d'élargissement des télomères. Elle est composée de 2 molécules de Tert associées à 2 sous-unités de Terc qui contiennent une matrice (molécule d'ARN) pour la synthèse *de novo*.

Alors que les eucaryotes unicellulaires possèdent des quantités de télomérases illimitées avec un maintien constant de la longueur des télomères, la plupart des eucaryotes pluricellulaires ont des quantités limitées de télomérases associées à un raccourcissement des télomères. Ce raccourcissement a lieu à chaque cycle cellulaire jusqu'à atteindre progressivement une taille critique qui entraîne un arrêt des divisions cellulaires : c'est la sénescence répliquative (Hayflick, 1965) (**Figure 26A**).

Au cours du processus menant à l'arrêt des divisions, les télomères subissent de nombreux changements, notamment vis-à-vis des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (d'Adda di Fragagna, 2003). Ainsi, les télomères forment une structure essentielle dans le contrôle de la stabilité du génome et de la viabilité cellulaire. Ils permettent de maintenir l'équilibre entre le vieillissement cellulaire et le risque de prolifération cellulaire incontrôlée associée aux cancers (Harley, 1990).

Par ailleurs, Bodnar et al. ont montré, sur des cultures cellulaires *in vitro*, un lien causal entre le raccourcissement des télomères et la sénescence cellulaire: l'introduction de la télomérase dans les cultures cellulaires a permis d'augmenter la taille des télomères et le nombre de divisions cellulaires au moins de 20 fois, dépassant ainsi leur durée de vie normale (Bodnar, 1998) (**Figure 26B**).

Bien que la télomérase soit le principal mécanisme d'élargissement des télomères il a été mis en évidence chez la levure une voie alternative pour maintenir la longueur des télomères impliquant très certainement un mécanisme de recombinaison (les télomères courts auraient

un fort pouvoir recombinaut). Cette voie alternative, appelée « Alternative Lengthening of Telomeres ou « ALT », pourrait aussi exister dans les cellules humaines, mais les mécanismes restent encore à élucider (Lundblad, 2002). (**Figure 26C et Figure 27**).

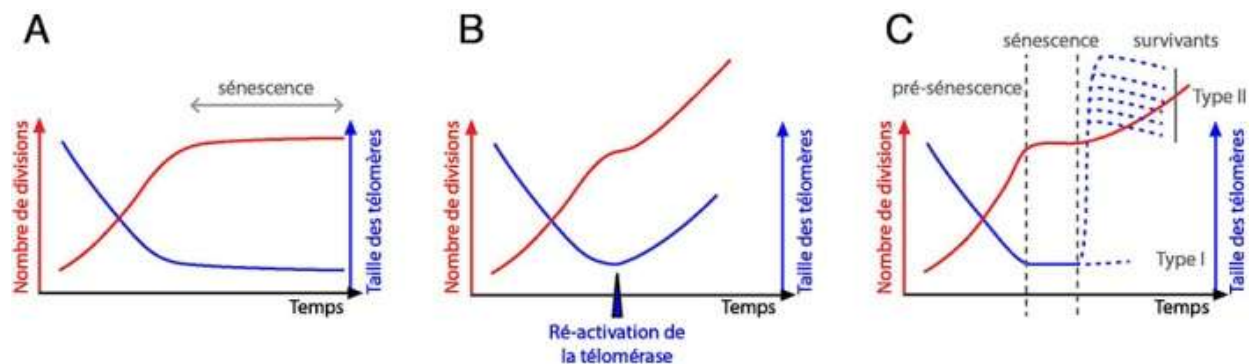


Figure 26 - Télomères et sénescence

(A) Comportement théorique d'une population des cellules humaines (fibroblastes) d'après les observations de Harley et Hayflick (Harley, 1990 ; Hayflick, 1965).

(B) Effet de la réactivation de la télomérase sur cellules humaines normales (cellules rétinienne et fibroblastes) (Bodnar, 1998).

(C) Comportement typique d'une population de *S. Cerevisiae* en culture liquide après perte de la télomérase (Lundblad, 2002).

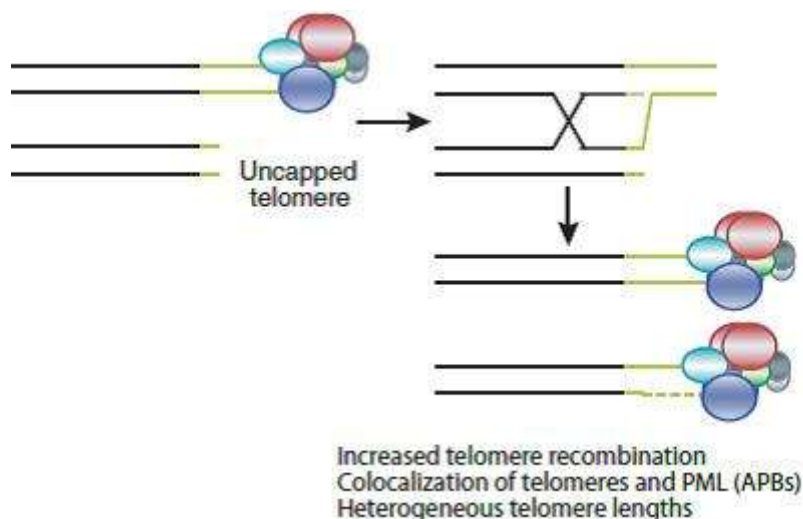


Figure 27 - Mécanisme alternatif « ALT » d'élargissement des télomères dans les cellules déficientes en télomérase (Blasco, 2007)

Chez l'homme, la plupart des cellules somatiques ne possèdent pas la télomérase. La télomérase est exprimée dans la lignée germinale, les cellules tumorales, les tissus embryonnaires, les lymphocytes et les cellules souches en lien avec la capacité proliférative de ces cellules (Härle-Bachor et Boukamp, 1996).

Initialement, ce sont les dyskératoses congénitales - désordres caractérisés par une mortalité précoce due à un dysfonctionnement de la moelle osseuse - qui ont permis d'étudier les maladies liées à des mutations de la télomérase. Les familles atteintes de cette maladie présentent un dysfonctionnement de leur moelle osseuse lié à un raccourcissement progressif des télomères (Mitchell, 1999). Dans tous les cas, les patients présentant des télomères courts indiquent qu'il existe une valeur seuil de la longueur des télomères compatible avec une absence de maladie. Ces observations ont permis de montrer que la longueur des télomères était un facteur important de la pénétrance de cette maladie chez les porteurs de la mutation.

Remarque : On ne sait pas si des télomères courts en absence de mutation peuvent conduire à cette maladie liée à l'âge.

De plus, de nombreuses pathologies liées à l'âge, ainsi que des syndromes de vieillissement prématuré (syndrome de Werner, anémie de Fanconi, ataxie téléangiectasie), sont caractérisés par un taux de raccourcissement des télomères supérieur à la normale, ce qui renforce l'existence d'un lien causal entre ce raccourcissement et le vieillissement.

Remarque : Il manque des preuves directes pour soutenir cette hypothèse.

Plus généralement, la longueur moyenne des télomères s'avère spécifique de l'espèce et peut varier en fonction du type cellulaire et de l'âge (Lejnine, 1995). Des études récentes, dans un double contexte - à la fois physiologique et pathologique - ont montré l'existence de mécanismes spécifiques au niveau des chromosomes de régulation de la longueur des télomères, déterminant un profil de longueur télomérique héréditaire et maintenu au cours de la vie (Gilson et Londoño-Vallejo, 2007). Cela suggère qu'il est avantageux de posséder des télomères courts et longs dans une même cellule. Par exemple, quelques télomères sentinelles, ceux présentant les longueurs les plus courtes, pourraient préférentiellement déclencher l'arrêt du cycle cellulaire avant que les autres télomères ne deviennent trop courts et instables, permettant ainsi de limiter l'extension des réarrangements chromosomiques en cas de prolifération excessive (Zou, 2004).

Néanmoins, avec l'âge, on assiste à un raccourcissement des télomères dans tous les tissus humains étudiés (Collins et Mitchell, 2002).

Enfin, chez l'homme, une méta-analyse a permis de caractériser la longueur des télomères comme un biomarqueur prédictif du risque de mortalité, ce lien était d'autant plus faible que l'âge augmentait (Boonekamp, 2013).

Chez la souris, déficiente en Tert, une accélération du raccourcissement des télomères a été associée à une diminution de la durée de vie, ce phénomène s'accroissant au fur et à mesure des générations jusqu'à provoquer l'infertilité des mâles et des femelles (Herrera, 1999).

Récemment, des travaux ont permis de montrer que le vieillissement pouvait être réversé par une réactivation de la reverse transcriptase chez des souris âgées (Jaskelioff, 2011). La thérapie génique, par transduction virale systémique de télomérase, chez la souris de phénotype sauvage, a permis de montrer le rôle de mTERT dans le vieillissement biologique, avec une amélioration de la santé et un rallongement de la durée de vie chez la souris sans augmenter l'incidence des cancers (Bernardes de Jesus, 2012).

Inversement, la majorité des tumeurs et des lignées de cellules immortelles possèdent des taux élevés de télomérase que l'on pense responsables du maintien de la croissance en prévenant le raccourcissement des télomères et en contournant la sénescence et l'apoptose (Blasco, 2007).

*Remarque : Bien qu'une très grande majorité des travaux permettent de conclure que le vieillissement chronologique s'accompagne d'un raccourcissement des télomères, quelques exceptions demeurent. En effet, chez l'oursin, la comparaison des espèces à courte durée de vie (*Lytechinus variegatus*, 3 à 4 ans) et à longue durée de vie (*Stroglylocentrotus franciscanus*, plus de 100 ans) n'a pas permis de mettre en évidence une association entre l'âge et le raccourcissement des télomères (Francis, 2006). Enfin, la perte de télomères dans certains cas*

peut conduire à des réarrangements chromosomiques qui peuvent favoriser la progression tumorale (Hackett et Greider, 2002).

De récents travaux ont aussi suggéré que les facteurs environnementaux tels qu'un stress élevé, le tabagisme et le niveau socio-économique bas sont corrélés avec des télomères courts (Valdes, 2005 ; Epel, 2004). Des télomères courts ont aussi été associés à l'obésité, certaines caractéristiques du vieillissement comme la déminéralisation osseuse, un risque élevé de mort prématurée et le développement de cancers et de maladies vasculaires (Gilson et Londoño-Vallejo, 2007).

Remarque : Toutes ces observations préliminaires n'ont pas été reproduites.

Bien que la contribution des télomères au vieillissement et à la transformation maligne soit fortement suggérée à partir de modèles cellulaires et murins, les mécanismes qui pourraient expliquer chez l'homme le rôle des télomères et son lien causal avec le vieillissement restent à mieux définir.

En effet, d'une part le raccourcissement des télomères est lié au vieillissement en induisant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire *in vivo*, puis la perte cellulaire et le dysfonctionnement tissulaire; d'autre part le raccourcissement des télomères peut aussi altérer la capacité des cellules souches à régénérer les tissus, conduisant à une altération tissulaire. Armanios et al ont aussi montré que des souris possédant la télomérase mais avec des télomères courts développaient des défauts dégénératifs, aussi bien au niveau des systèmes hématopoïétiques, qu'immunitaires (Armanios, 2009). Par conséquent, l'intégrité de télomères est contrôlée par des mécanismes intrinsèques et extrinsèques suggérant des liens inattendus entre les altérations de l'ADN télomérique, l'immunité, le système hématopoïétique et le cancer. Par exemple, dans une étude récente, la surexpression de TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 2) dans les cellules tumorales diminue leur capacité à recruter et à activer les cellules NK (Natural Killer) et conduit à une augmentation de la croissance tumorale et à une diminution de la survie globale (Biroccio, 2013).

En maintenant l'homéostasie et l'intégrité des télomères, la télomérase joue un rôle crucial dans l'immortalité cellulaire et la tumorigénèse (Shay et Wright, 2011).

Chez le homard (*Homarus americanus*), qui grandit toute sa vie et chez qui l'occurrence de la sénescence est faible, la télomérase a été identifiée dans tous les organes. Les auteurs suggèrent que la télomérase est un mécanisme conservé pour maintenir la capacité de prolifération à long terme des cellules en prévenant la sénescence, non seulement dans les stades précoces de l'embryogénèse, mais aussi dans les organismes adultes (Klapper, 1998).

La télomérase est aussi décrite comme ayant une activité indépendante dans plusieurs fonctions cellulaires essentielles comme la régulation de l'expression génique, la fonction mitochondriale, la survie cellulaire, la transformation cellulaire etc., sans que les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation soient élucidées. Des données récentes ont permis de montrer que la télomérase pouvait être un modulateur de la voie de signalisation NF-KB (facteurs nucléaires de transcriptions inductibles qui régulent l'expression d'un grand nombre de gènes en réponse à des stimuli physiologiques et pathologiques et autres stress) et réguler l'expression des MMP9 (composant majeur de la membrane basale impliqué dans la progression tumorale) (Ding, 2013).

Enfin, de plus en plus de données publiées montrent que les télomères sont sous contrôle épigénétique (Garcia-Cao, 2004). A l'instar de ce qui a été décrit chez la levure et chez la

drosophile, la structure de la chromatine aussi se révèle importante dans la régulation et le fonctionnement des télomères et des régions subtélomériques chez les mammifères. Des modifications des histones dans les régions télomériques ou des méthylations de l'ADN dans les régions subtélomériques sont corrélées avec la dérégulation de la longueur des télomères. Cela suggère l'existence d'une structure épigénétiquement régulée au niveau des télomères et qui est importante pour le contrôle de leur longueur (Blasco, 2007).

1.2.1.5 Altérations épigénétiques

Depuis la naissance de l'épigénétique en 1942, la définition de cette science n'a cessé d'évoluer. Actuellement, le terme « épigénétique » se réfère à un ensemble de mécanismes moléculaires modulant l'expression génique sans altération des séquences nucléotidiques. Ces caractères héréditaires au cours des divisions cellulaires sont généralement réversibles ou « reprogrammables ».

Ainsi, chacun hérite d'une information génétique portée par l'ADN et transmise par les lois de Mendel, et une information épigénétique non portée par l'ADN et dont les bases moléculaires ne sont que partiellement élucidées.

Les mécanismes épigénétiques comprennent une variété de modifications chimiques du matériel génétique qui se superposent au génotype pour former l'épigénotype, ainsi que l'intervention d'ARN non codants agissant de façon indirecte sur l'expression des gènes. Récemment, Berger et al ont proposé une description des phases successives des modifications épigénétiques (**Figure 28**) permettant de mieux comprendre les différents mécanismes liés à la transmission épigénétique (Berger, 2009).

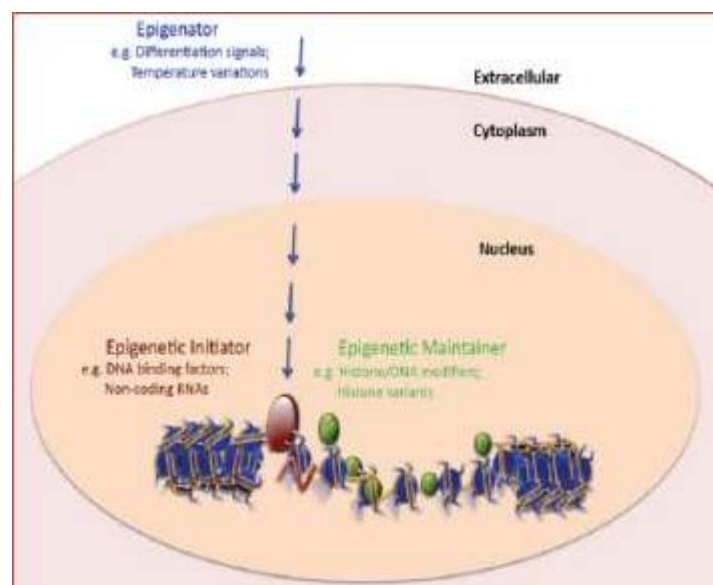


Figure 28 - Les différents mécanismes liés à la transmission épigénétique (Berger, 2009)

Une modification épigénétique résulte de 3 événements successifs:

- le signal « Epigénoteur » est un changement transitoire de l'environnement cellulaire.
- le signal « Initiateur épigénétique » traduit le signal épigénoteur en une modification locale et ciblée de la chromatine.
- le signal « Stabilisateur épigénétique » fige la modification de la chromatine par divers processus (méthylation de l'ADN ou des histones, déacétylation des histones).

Les modifications épigénétiques englobent une grande variété de mécanismes qui peuvent cibler l'ADN (méthylation des résidus cytosine précédant un résidu Guanine nommée « CpG »), l'ARN ou les protéines au niveau de la chromatine (méthylation, acétylation, phosphorylation et ubiquitination (Korkmaz, 2011) etc.

Alors que les modifications épigénétiques sont l'objet d'une recherche intense depuis des années en cancérologie, le « vieillissement épigénétique » est une discipline émergente.

1.2.1.5.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN met en œuvre des enzymes spécialisées, les DNA méthyltransférases (DNMTs) capables de maintenir le profil de méthylation au cours des divisions cellulaires ou bien de méthyliser l'ADN *de novo*, notamment au niveau des séquences régulatrices des gènes, conduisant à une mise en silence de leur expression.

Les toutes premières études réalisées à partir des années 80 ont permis **d'identifier une diminution du profil global du taux de méthylation** avec l'âge dans divers tissus de rongeurs et chez l'homme (Wilson et Jones, 1983 ; Tawa, 1990 ; Fuke, 2004 ; Bollati, 2009).

Remarque : Inversement, des études menées sur des jumeaux homozygotes ont permis de révéler l'accumulation de variants épigénétiques avec l'âge (Fraga et Esteller, 2005). Bien que ces changements, identifiés par « genome wide scan », n'aient pas pu être reproduits par Bocklandt et al, ces derniers ont cependant identifié un sous-groupe de loci hautement corrélés à l'âge (près de 88 sites CpG pour lesquels le pourcentage de méthylation à partir de prélèvements de salive est significativement corrélé à l'âge). De façon intéressante, les auteurs ont pu établir un modèle prédictif de l'âge basé sur le statut de méthylation de 2 cytosines dans le génome, expliquant 73% de la variance de l'âge (Bocklandt, 2011). La corrélation du degré de méthylation avec l'âge a aussi été montrée à partir de prélèvements de sang et au travers d'une étude portant sur 230 paires de jumeaux monozygotes âgés de 18 à 89 ans (Talens, 2012).

Par ailleurs, de nombreuses autres études ont mis en évidence des gènes ou des régions génomiques qui sont soit hyperméthylées soit hypométhylées au cours du vieillissement. Par exemple, l'hyperméthylation, mise en évidence préférentiellement dans les îlots CpG (Christensen, 2009), a aussi été détectée au niveau des promoteurs bivalents (contenant la marque activatrice H3K4m3 et la marque suppressive H3K27m3) qui sont associés aux gènes de développement (Rakyan, 2010), ainsi qu'au niveau des cibles des protéines Polycomb (Teschendorff, 2010).

Remarque : Si de nombreux changements liés à l'âge sont tissus dépendants, de nombreuses études ont aussi montré que les signatures CpG liées à l'âge peuvent être définies indépendamment du type de tissu, du sexe (Horvath, 2013)...

La perte du taux global de méthylation au cours du vieillissement est probablement due à une déméthylation de l'hétérochromatine comme une conséquence de la perte d'efficacité progressive de DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1, enzyme codée par le gène DNMT1 chez l'homme) ou/et d'un ciblage erroné de l'enzyme par d'autres cofacteurs (Fraga, 2007-a). Néanmoins, cette hypothèse nécessite d'être confirmée. Il est aussi possible que la réponse naturelle de la cellule à une perte de méthylation dans les séquences d'ADN répétées

soit une surexpression de l'ADN de novo méthylase DNMT3b, comme cela a été observé dans des cultures de fibroblastes humains (Casillas MA, 2003).

Comme l'hypométhylation globale de l'ADN, l'hyperméthylation aberrante des régions promotrices et la légère surexpression de la DNMT sont connues dans les altérations épigénétiques de cancers, Fraga a émis l'hypothèse que l'accumulation de ces altérations épigénétiques au cours du vieillissement contribue directement à la transformation tumorigène. Cependant, cette hypothèse n'a pas été directement démontrée selon un point de vue mécanistique (Figure 29 et Figure 30) (Fraga et Esteller, 2007-a; Fraga, 2007-b).

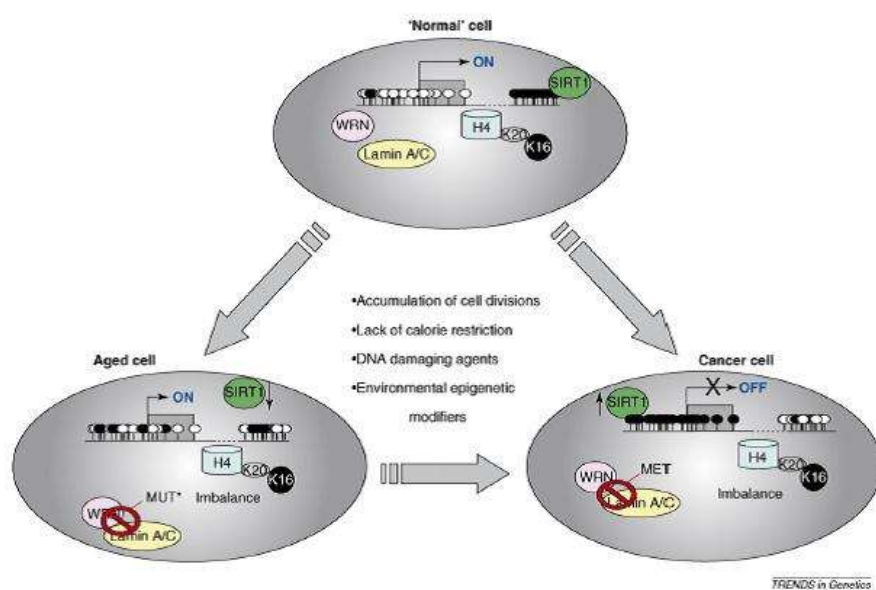


Figure 29 - L'épigénome de cellules normales, âgées et cancéreuses. (Fraga et Esteller, 2007-a)

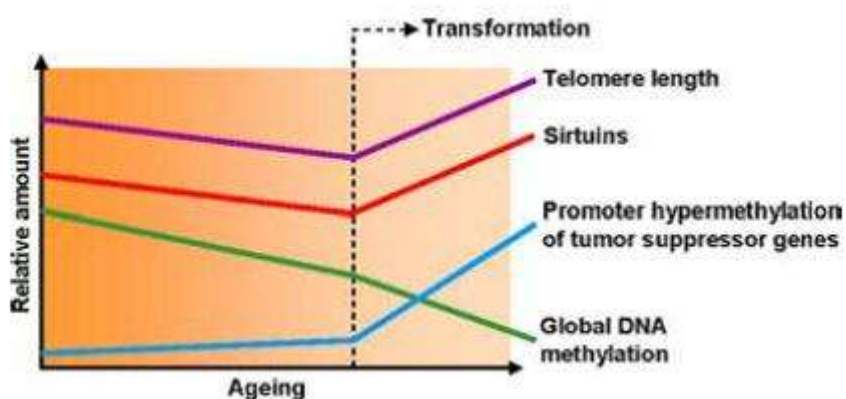


Figure 30 - Evolution des mécanismes moléculaires épigénétiques au cours du vieillissement et du cancer (Fraga, 2007-b)

1.2.1.5.2 Silence épigénétique des gènes progéroïdes

Des études récentes ont montré que l'inactivation épigénétique de gènes associés aux syndromes de Werner et d'Hutchinson-Gilford, i.e respectivement le gène WRN qui code pour un membre d'hélicases de la famille RecQ et le gène LMNA qui code pour un gène nucléaire lamin A/C, peut aussi contribuer directement à la transformation maligne.

Le gène lamin A/C a été le premier gène identifié comme impliqué dans l'âge par son activité de suppression de tumeur. Il est fréquemment réprimé dans des cancers tels que leucémie et lymphomes qui sont associés à des régions promotrices hyperméthylées (Agrelo, 2005). Quant au gène WRN, il est souvent réprimé par les régions promotrices hyperméthylées riches en CpG dans le cancer chez l'homme (Agrelo, 2006).

1.2.1.5.3 Modification des histones

Des études récentes montrent que les modifications de la méthylation des histones ont un rôle dans la régulation de la durée de vie des organismes et du vieillissement. De plus en plus de données mettent en exergue que le taux global de méthylation se modifie avec l'âge. Il faut noter que la perte de l'équilibre entre les marqueurs de méthylation stables et instables dans les cellules souches chez l'adulte pourrait contribuer au déclin de la fonctionnalité du tissu avec l'âge (Pollina et Brunet, 2011). Plus particulièrement, les taux de méthylation H4K20m3 augmentent avec l'âge dans le cerveau des souris (Wang, 2010) et dans le foie des rats (Sarg, 2002), mais des taux de méthylation H4K27m3 diminuent dans les cellules somatiques de *C. elegans* (Maures, 2011). Chez la drosophile, il a été décrit une diminution du taux de H3K9me2, mais aussi une augmentation de H3K9me3 (Larson, 2012 ; Wood, 2010). L'hétérochromatine semble diminuer dans des cellules de sujets âgés ou encore dans des cellules de patients atteints du syndrome de Hutchinson-Gilford (Scaffidi et Misteli, 2005 ; Scaffidi and Misteli, 2006). Les cellules de sujets avec HPGS ont une augmentation du taux de H3K27me3 sur le chromosome X ainsi qu'une diminution du taux de H3K27 trimethyltransferase EZH2 (Shumaker, 2006). L'ensemble de ces résultats suggère un lien causal de ces modifications avec l'âge (Greer, 2014 ; McCauley et Dang, 2014) (**Tableau 5**).

Model	Tissu	Modification	Change	Reference
<i>C. elegans</i>	Cellules somatiques	H4K27me3	Diminution	(Maurès, 2011)
Drosophile	Animal entier	H3K4me3	Diminution	(Wood, 2010)
	Animal entier	H3K9me3	Augmentation	(Wood, 2010)
	Animal entier	H3K36me3	Diminution	(Wood, 2010)
	Animal entier	H3K9me2	Diminution	(Larson, 2012)
Mammifères	Rein et foie de rat	H4K20me3	Augmentation	(Sarg, 2002)
	Cerveau souris	H4K20me1	Diminution	(Wang, 2010)
	Cerveau souris	H3K27me3	Augmentation	(Wang, 2010)
	Cerveau souris	H3K36me3	Diminution	(Wang, 2010)
	Cerveau souris	H3K79me1/2	Augmentation	(Wang, 2010)
	Cerveau macaque	H3K4me2	Augmentation	(Han, 2012)
HPGS	Fibroblastes	H4K20me3	Augmentation	(Shumaker, 2006)
	Fibroblastes	H3K9me3	Diminution	(Shumaker, 2006)
	Fibroblastes	H3K27me3	Diminution	(Shumaker, 2006)

Tableau 5 - Modification des histones (changements du taux global de méthylation) associée à l'âge

Malgré quelques données conflictuelles en fonction des modèles étudiés, il y a une tendance à l'augmentation des marqueurs d'histone « activateurs » (H3K4me2/3, H3K36me3) et à la diminution des marqueurs « répressifs » (H3K27me3, H3K9me2/3) indicatifs d'un génome euchromatique, plus activement transcrit. Cela est en accord avec des observations préliminaires montrant une conformation de chromatine ouverte dans les cellules et organismes âgés (Tsurumi et Li, 2012). Il est possible qu'un des rôles de la chromatine décondensée dans les organismes âgés soit de promouvoir la transcription de gènes ayant des fonctions anti-âge (Han, 2012), même si une telle conformation est le plus souvent associée avec une augmentation de l'expression de gènes délétères (Tsurumi et Li, 2012). Bien que l'ensemble des études citées ci-dessus montrent une dérégulation de la méthylation des histones, on ne sait pas si ces changements sont une cause ou un effet du processus de vieillissement. McCauley et Wang, dans leur revue publiée en 2014 dédiée à la méthylation des histones, ont rassemblé les données de plusieurs études. Ces dernières suggèrent fortement le rôle causal de la méthylation des histones dans le vieillissement (Tableau 6).

Remarque : Néanmoins, les mécanismes par lesquels les méthylases et les déméthylases identifiées régulent la durée de vie restent à déterminer.

System	Protein	Effect	Mark
<i>C. elegans</i>	UTX-1 ⁺	increase lifespan	H3K27me3
	ASH-2	increase lifespan	H3K4me3
	SET-2	increase lifespan	H3K4me3
	WDR-5 ⁺⁺	increase lifespan	H3K4me3
	RPD-2	decrease lifespan	H3K4me3
	SET-15	increase lifespan	
	SET-9	increase lifespan	none found
	SET-26	increase lifespan	none found
	LSD-1	increase lifespan	
	MES-2	increase lifespan	
	JMJD-2	increase lifespan	
	T26A5	increase lifespan	
<i>Drosophila</i>	E(z)	increase lifespan	
	Esc	increase lifespan	
Mammals	G9a ⁺	inhibit SASP	
	GLP ⁺	inhibit SASP	

Tableau 6 – Régulation du vieillissement par des histones méthyltransférases et déméthylases (McCauley et Dang, 2014)

D'autres mécanismes épigénétiques font intervenir des histones déacétylases ou sirtuines (une famille de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) dépendante déacétylase) considérées comme des molécules-clés dans la régulation de l'âge mais aussi des maladies incluant cancers, désordres métaboliques et maladies neurodégénératives (Park, 2013).

Chez la levure, il a été montré que la délétion du gène sir-2 était associée à une diminution de la durée de vie, alors que la surexpression de ce gène induisait un rallongement de la durée de vie (Guarente, 2011). Des études sur d'autres modèles ont rapporté que la stimulation de l'expression de gènes orthologues chez *C.elegans* (sir-2.1) et la drosophile (dSir2) pouvait aussi rallonger la durée de vie (Tissenbaum et Guarente, 2001).

Remarque : Cette observation a été récemment considérée comme modeste chez C. elegans (Viswanathan et Guarente, 2011), et le rôle des sirtuines dans la régulation de la longévité chez C.elegans et la drosophile est controversé (Burnett, 2011).

Chez la souris, une délétion ou surexpression de SIRT1 a permis de caractériser ce gène comme un régulateur positif de la longueur des télomères, car SIRT1 atténuait le raccourcissement des télomères associé à l'âge (Palacios, 2010). De plus, sa surexpression permet d'améliorer des aspects de la santé au cours du vieillissement (amélioration de la protection hépatique des dommages de l'ADN et métaboliques) mais sans augmenter la longévité (Herranz, 2010).

Comme son homologue Sir2, SIRT1 est impliqué dans la sénescence répliquative et pourrait, selon d'autres auteurs, avoir un rôle dans la longévité chez les mammifères (Sauve, 2006 ; Maiese, 2011). De plus, des études récentes ont aussi démontré que **SIRT1 régule des processus métaboliques et physiologiques interconnectés**, tels que la résistance au stress, le métabolisme, l'apoptose, l'inflammation (Xie, 2013, Maiese, 2011), la régulation de facteurs transcriptionnels et l'amélioration de la stabilité génomique (Dai et Faller, 2008) (**Figure 31 et Figure 32**).

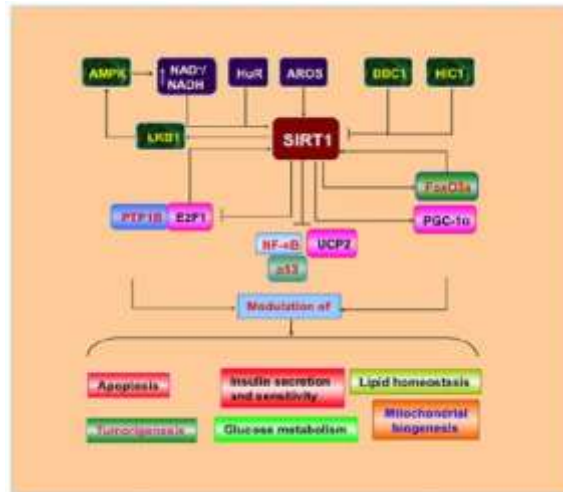


Figure 31 - Maiese, 2011

“Cell signaling pathways of SIRT1. The RNA binding protein HuR and a nuclear protein active regulator of SIRT1 (AROS) can promote SIRT1 activity. AMP activated protein kinase (AMPK) can activate SIRT1 through increasing the level of NAD⁺/NADH ratio, but there exists a positive feedback, activated SIRT1 deacetylates the serine-threonine liver kinase B1 (LKB1) and subsequently activates AMPK. In contrast, hypermethylated in cancer 1 (HIC1) and deleted in breast cancer 1 (DBC1) negatively regulates the activity of SIRT1. Downstream of SIRT1 are the FoxO transcription factors, peroxisome proliferators-activated receptor coactivator-1α (PGC-1α), protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), p53, nuclear factor-κB (NF-κB), apoptotic transcription regulator E2F1, and the uncoupling protein gene UCP2. SIRT1 can, through modulating its multiple targets, regulate lipid metabolism, insulin secretion and sensitivity, mitochondrial function, and cell survival.”

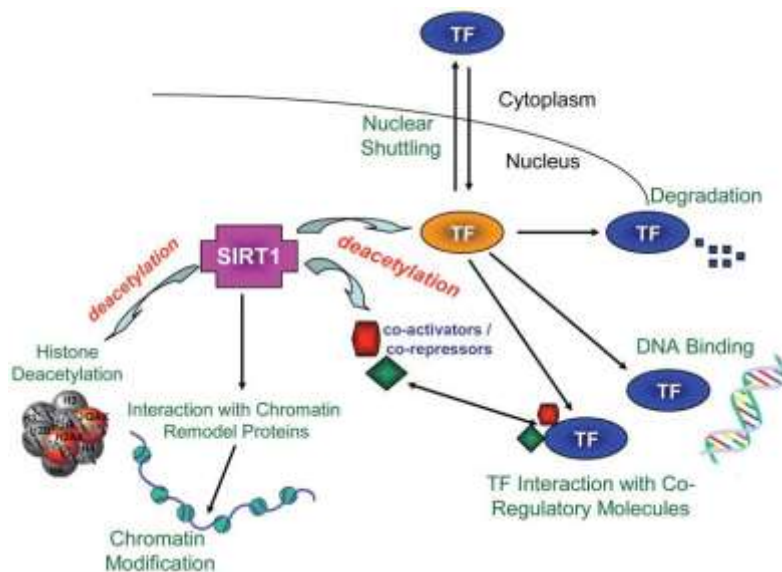


Figure 32 - Dai and Faller, 2008

“Sirtuins regulates multiple aspects of transcription. SIRT1 can deacetylate transcription factors (TF) and regulate their functions by altering their sub-cellular location, changing their expression level, altering their binding to DNA and changing their interactions with regulatory proteins. SIRT1 can also directly deacetylate co-repressor or co-activator, histone and interact with chromatin remodeling proteins to regulate transcription.”

Bien que le rôle des 7 sirtuines (SIRT1 à SIRT7) chez les mammifères (homologues de la Sir2 chez la levure) dans la régulation de la longévité ne soit pas très clair (Baur, 2010), des études menées chez la souris ont montré récemment que SIRT6 augmentait leur durée de vie. Des souris déficientes en Sirt6 (Sirt6^{-/-}) et d'apparence normale à la naissance présentaient des syndromes dégénératifs de vieillissement prématuré dès trois semaines, et mouraient rapidement (Mostoslavsky, 2006). Des souris mâles transgéniques surexprimant SIRT6 avaient

une durée de vie plus longue que les animaux-contrôles associés à des modifications ou à des altérations des marqueurs de la voie de signalisation de l'insuline par exemple une diminution des taux sériques IGF1 (Kanfi, 2012). Par ailleurs, grâce aux méthodes bio-informatiques appliquées à la génomique, des études ont montré qu'une déficience en SIRT6 conduisait à une activation de nombreux programmes transcriptionnels identiques à ceux observés dans les issus âgés, tels que les gènes contrôlés par NF- κ B (Kawahara, 2009). Enfin, SIRT 6 contribue à la longévité grâce à son rôle dans la stabilité génomique (Mostoslavsky, 2006) et l'homéostasie du métabolisme glucidique par désacétylation de l'histone H3K9 (Kawahara, 2009).

Chez l'homme, SIRT3 (localisée dans la membrane interne de la mitochondrie) est directement liée à la longévité et hautement exprimée chez les individus à longue vie (Bellizzi, 2005). Plus récemment, la surexpression de SIRT3 a permis d'améliorer la capacité régénérative des cellules hématopoïétiques âgées (Brown, 2013).

En résumé chez les mammifères, SIRT1, SIRT3 et SIRT6 contribuent à l'amélioration de l'état de santé et à l'allongement de la durée de vie (Figure 33).

Remarque : Il reste à déterminer si les sirtuines sont capables simplement de s'opposer au vieillissement, voire de le rendre réversible ou encore sont associées au vieillissement (Brown, 2013).

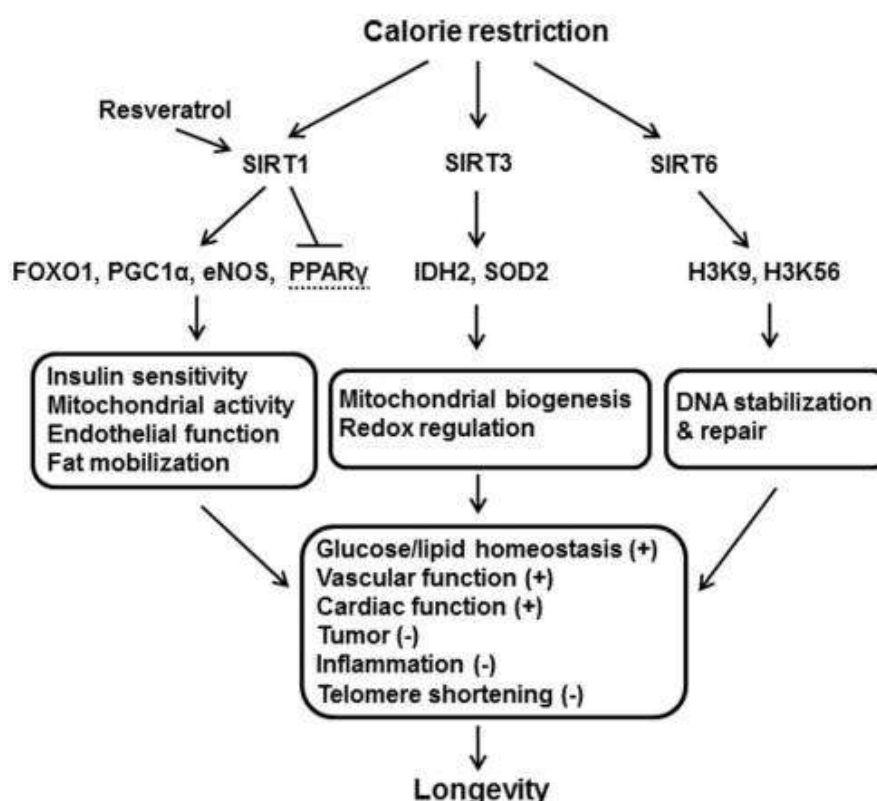


Figure 33 - Park, 2013

SIRT-mediated pathways that induce anti-aging effect of CR in mammals. (+), enhancement; (-), inhibition

Abbreviations: NOS, endothelial nitric oxide synthase; FOXO, forkhead box O; GDH, glutamate dehydrogenase; H3K9, histone H3 lysine 9; H3K56, histone H3 lysine 56; IDH2, isocitrate dehydrogenase 2; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α ; SOD2, superoxide dismutase 2.

1.2.1.5.4 Remodelage de la chromatine

Le vieillissement physiologique ou prématuré est caractérisé par de multiples défauts au niveau de la structure de la chromatine (Feser et Tyler, 2011).

Quelques-uns de ces changements chez la levure sont responsables du phénotype associé au vieillissement (Dang, 2009).

Chez l'homme, des cultures de cellules d'une patiente atteinte de HGPS (syndrome de Hutchinson-Gilford) et exprimant la progérine (une forme mutante tronquée de la lamin A) ont permis d'identifier, au niveau de la morphologie du noyau, des anomalies liées à des altérations de l'hétérochromatine et de la méthylation des histones (Shumaker, 2006). Plusieurs études ont montré que les modifications au niveau de l'ADN et des histones agissent de concert avec des protéines chromosomales-clés, telles que la protéine de l'hétérochromatine 1 α (HP1 α) et les facteurs chromatinien remodelant i.e les protéines du groupe Polycomb (PcG), le groupe Trithorax (TrxG) et le complexe NuRD (NUcleosome Remodelling Deacetylase), dont les taux diminuent avec l'âge aussi bien dans les cellules normales que pathologiques âgées (Pegoraro, 2009 ; Pollina et Brunet, 2011). Par ailleurs, le lien causal entre ces altérations de la chromatine et le vieillissement a pu être mis en évidence chez la drosophile : une surexpression d'une protéine de la chromatine (HP1 α) rallonge la durée de vie et retarde l'altération de l'intégrité musculaire caractéristique du vieillissement dans ce modèle (Larson, 2012 ; Demontis et Perrimon, 2009). De plus, une étude des modifications des signatures épigénétiques au cours du vieillissement chez la drosophile a montré une diminution globale des H3 et du marqueur de l'hétérochromatine H3K9me2 ainsi qu'une délocalisation de HP1 α . Ces signatures ont été retrouvées chez *C. elegans* et chez l'homme (Haithcock, 2005; Scaffidi et Misteli, 2008).

Tsurimi et Li définissent un modèle de vieillissement de la chromatine comme une «redistribution de la chromatine», aussi bien chez les animaux que chez l'homme dans lesquels on observe un déclin total de l'hétérochromatine constitutive avec une augmentation de l'hétérochromatine à des loci spécifiques, contribuant à l'instabilité génomique et à des altérations de l'expression de gènes. (Tsurumi et Li, 2012). Les altérations épigénétiques résultant d'une perte globale de l'hétérochromatine pourraient être à l'origine de nombreux événements moléculaires associés au vieillissement : théorie des radicaux libres, sénescence génétiquement programmée, raccourcissement des télomères, instabilité génomique, apport nutritionnel et voie de signalisation associée (**Figure 34**).

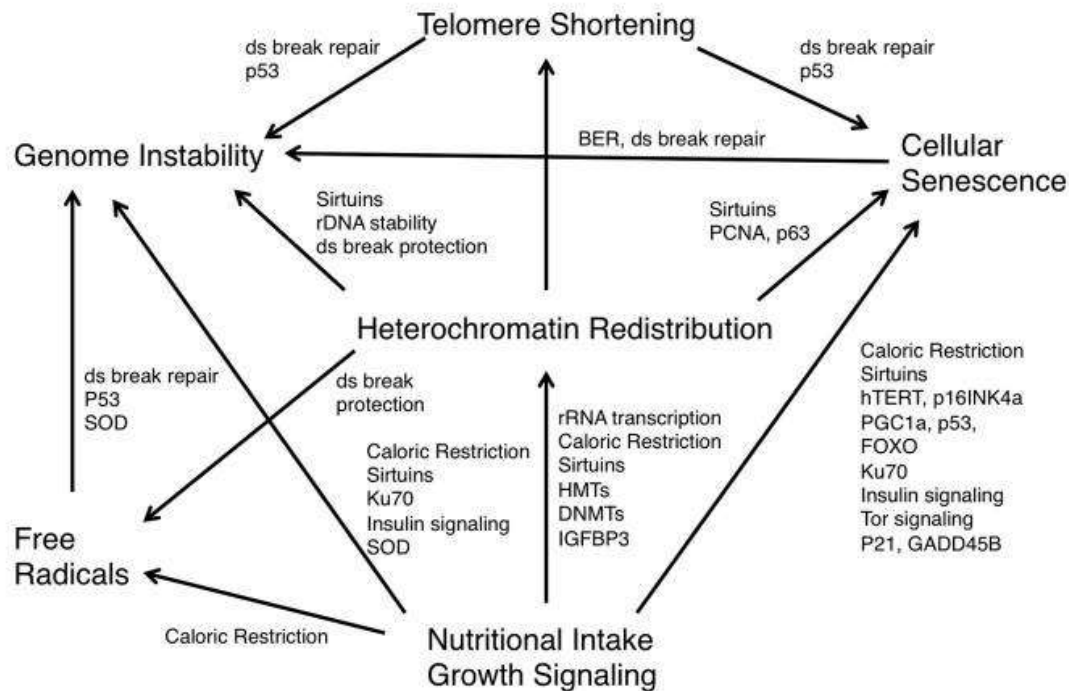


Figure 34 - Tsurumi et Li, 2012

“Epigenetic changes resulting in a decrease and redistribution of global heterochromatin may underlie the various models of aging. The models of free radical accumulation, genetically programmed senescence, telomere shortening, genomic instability, nutritional intake and growth signaling are distinct, yet overlapping theories of aging that may all be linked by heterochromatin redistribution.”

1.2.1.5.5 Altérations transcriptionnelles

Au cours du vieillissement, la dérégulation stochastique de l'expression génique a été décrite chez la souris (Bahar, 2006), ainsi que la production anormale d'ARNm chez l'homme. Grâce à des prélèvements sanguins sur une large cohorte d'individus (n= 698 sujets de 30 à 104 ans) et grâce à la technologie des puces à ADN « DNA microarray », les auteurs ont identifié des transcrits liés au vieillissement surtout impliqués dans l'inflammation et la fonction immunitaire (Harries, 2011). Ces signatures transcriptionnelles associées au vieillissement affectent aussi les ARN non codants qui influent sur la durée de vie en ciblant des molécules du réseau associées à la longévité (p53, DAF 16/FOXO...). Par exemple, l'extension de la durée de vie chez *C.elegans*, due à la perte des cellules germinales, est régulée par le microRNA mir-71 qui dépend de la fonctionnalité de daf-16 (facteur de transcription nécessaire à l'extension de la durée de vie observée sur la mutation des récepteurs de l'insuline-like daf-2 chez *C. elegans*) (Boulas et Horvitz, 2012). La stimulation ou la répression des miRNA a été décrite dans de nombreux travaux qui confirment leur rôle dans la régulation du vieillissement chez *C. elegans* et la souris, et dans l'allongement de la durée de vie chez *C. elegans* et la drosophile (Smith-Vikos et Slack, 2012).

Tous les travaux de recherche en épigénétique précédemment cités soulignent l'intérêt de cette science pour mieux comprendre les mécanismes d'action des modifications épigénétiques qui, de par leur caractère réversible, permettront de développer de nouveaux traitements dans la prévention de pathologies liées à l'âge, des altérations liées au vieillissement, voire permettront un rallongement de la durée de vie.

Par exemple, les protéines glycosylées (Glycans), dont on sait qu'elles sont sous régulation épigénétique (Lauc, 2013), pourraient constituer dans un avenir proche un marqueur de l'âge facilement accessible avec des applications pratiques dans les traitements de maladies et/ou du vieillissement du système immunitaire (Spector, 2013). En effet, des travaux récents (Kristic, 2013) ont permis de caractériser des profils différents de glycosylation d'IgG en fonction de l'âge et de déterminer un index d'âge -GlycanAge index- à partir de seulement trois glycans fortement associés à l'âge chronologique et à l'âge biologique (Insuline, glucose, BMI...). L'évaluation de l'âge du système immunitaire est particulièrement intéressante, comme on sait que la glycosylation affecte fortement la fonction des immunoglobulines par leur implication dans les phénomènes inflammatoires, par exemple (Gornik, 2011), et le système immunitaire en général (Rudd, 2001).

1.2.1.6 Modifications post-traductionnelles non-enzymatiques des protéines

A côté des modifications post-traductionnelles enzymatiques impliquées dans la maturation des protéines natives (glycosylation par exemple), tout au long de la vie, toutes les protéines font l'objet de modifications post-traductionnelles tardives. En effet, les protéines sont les principales cibles des ROS (Berlett et Stadtman, 1997) qui agissent directement ou indirectement par le biais des produits d'oxydation issus des réactions avec les lipides et carbohydrates qui peuvent réagir avec les protéines. Ces modifications consistent en des réactions chimiques irréversibles (oxydation, glycation/glycoxydation, conjugaison avec des produits de peroxydation des lipides) (Baraibar et Friguet, 2013; Jaisson et Gillery, 2010) (**Figure 35**). Souvent évolutives et cumulatives, elles aboutissent à l'altération de leurs propriétés structurales et fonctionnelles, ainsi que de leurs interactions moléculaires et cellulaires.

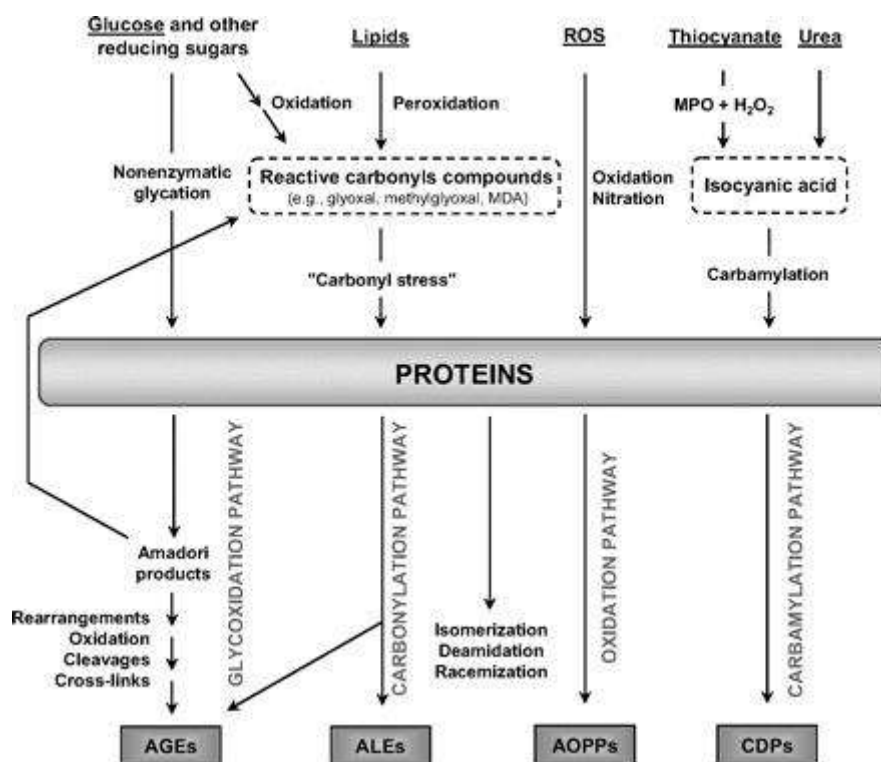


Figure 35 - Molecular aging of proteins (Jaisson et Gillery, 2010)

Ce sont les protéines carbonylées qui constituent le marqueur de protéines oxydées le plus communément utilisé pour l'étude du vieillissement et du stress oxydatif, car il a été montré que la carbonylation conduisait, entre autres, à une perte de fonction de la protéine et à une augmentation de la sensibilité thermique (Berlet et Stadtman, 1997). Le contenu en protéines carbonylées a été décrit dans les tissus comme une fonction de l'âge (Levine et Stadtman, 2001). Il augmente dans des cultures humaines de fibroblastes avec l'âge du donneur (Oliver, 1987) et au cours de la sénescence répllicative (Ahmed, 2007).

Au final, l'accumulation de dommages macromoléculaires incluant les protéines endommagées par oxydation constitue une caractéristique du vieillissement cellulaire et de l'organisme. Par ailleurs, différents modèles animaux et humains de vieillissement et de maladies liées à l'âge ont été utilisés pour mieux caractériser le rôle fonctionnel de ces protéines.

Aujourd'hui, une trentaine de pathologies humaines sont connues pour être associées à une conformation anormale des protéines, dans lesquelles au moins une protéine particulière avec un défaut de conformation s'accumule dans une structure fibrillaire appelée amyloïde. L'accumulation d'agrégats de telles protéines favorise le développement des maladies neurodégénératives, telles que la maladie Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington (Powers, 2009). Le développement de modèles animaux transgéniques caractérisés par des formes mutantes de gènes codant pour cette protéine fibrillaire a permis de révéler la contribution de cette protéine dans ces maladies (Moreno-Gonzalez et Soto, 2012). De plus, des études *in vitro* ont montré que l'accumulation de ces protéines conduisait à une activité cytotoxique, à la mort cellulaire et à l'altération tissulaire (Demuro, 2005).

Remarque : Les mécanismes de cytotoxicité sont encore inconnus et la preuve finale de l'implication causale de ces agrégats dans les maladies dégénératives reste à démontrer. Tel sera le cas lorsque l'on pourra traiter ces maladies ou rendre réversible leur formation (Cuanalo-Contreras, 2013). A part deux ou trois exceptions, ce but est loin d'être atteint (Johnson, 2012).

De plus, des données suggèrent fortement que les cellules et tissus âgés sont plus enclins à accumuler ces agrégats de protéines dans la mesure où le vieillissement s'avère un risque majeur du développement de ces maladies dues à des anomalies de conformation des protéines. D'ailleurs, un rallongement de la durée de vie chez *C. elegans* a été induit à la suite du blocage de la formation de ces agrégats (Kikis, 2010).

Remarque : Il reste à déterminer si cette accumulation est une cause du dysfonctionnement cellulaire ou bien une conséquence du déclin de l'homéostasie protéique au cours du vieillissement.

A ce jour, le rôle de ces protéines dans le vieillissement chronologique n'a pas été étudié en détail, même si des rapports récents décrivent une accumulation de protéines insolubles au cours du vieillissement ainsi que leur implication dans les maladies neurodégénératives dans différentes espèces (David, 2010).

1.2.1.6.1 Rôle des protéines chaperonnes

Par ailleurs, de nombreuses études ont permis de montrer un impact causal du déclin des protéines chaperonnes (une classe de protéines chaperonnes caractérisées par leur capacité à moduler l'expression et la conformation d'autres protéines) sur le vieillissement (Finkel et Holbrook, 2000). L'accumulation des agrégats dans les maladies neurodégénératives est associée aux « Heat shock proteins » (Hsps). Chez la drosophile porteuse de ce type de maladies, les phénotypes de neurodégénérescence et de toxicité peuvent être supprimés par une surexpression de la fonction de Hsp spécifiques à la drosophile, i.e Hsp70, et hsp68 (Tower, 2011). De plus, dans ces modèles transgéniques, aussi bien chez la drosophile que chez *C. elegans*, la surexpression des protéines chaperonnes a été associée à la longévité.

Remarque : Il existe des travaux qui ne montrent pas d'augmentation de la durée de vie à la suite d'une surexpression de Hsp70, par exemple (Minois, 2001).

Chez *C. elegans*, la surexpression de Hsp16 est dépendante du facteur de transcription FOXO, indiquant un mécanisme impliqué dans l'effet feedback sur la voie de signalisation IIS. Chez la drosophile et chez *C. elegans*, l'activation de la voie JNK peut augmenter la durée de vie via l'activation de FOXO (**Figure 36**) (Morrow, 2004).

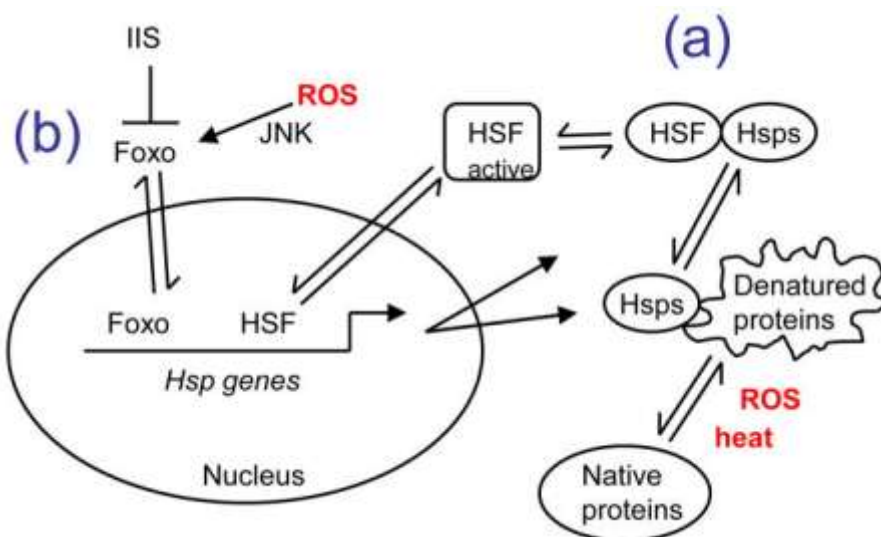


Figure 36 - Induction des gènes Hsps via les ROS et les protéines dénaturées (Tower, 2011)

Les protéines dénaturées activent les gènes Hsp à travers le facteur de transcription HSF(a) et Foxo(b)

Chiang et al ont récemment montré que l'activation du facteur de transcription HSF-1 est nécessaire pour moduler la longévité chez *C. elegans* (Chiang, 2012). De plus, dans les cellules humaines, la déacétylation de HSF-1 par SIRT1 prolonge la liaison de HSF-1 au niveau du promoteur hsp70, alors que la répression de SIRT1 provoque la diminution de l'expression de la réponse des Hsps. Ainsi, SIRT1 s'avère un marqueur important de l'homéostasie protéique et de la réponse des HSP (**Figure 37**) (Westerheide, 2009).

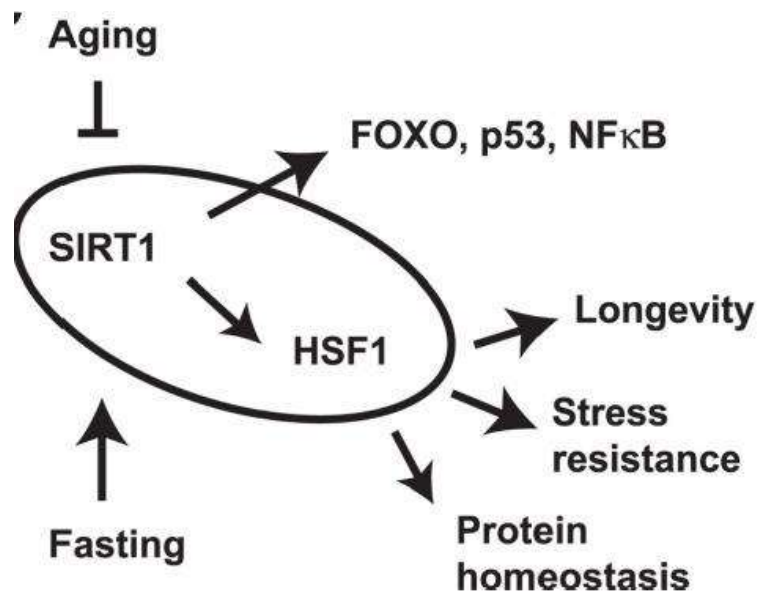


Figure 37 - Effets biologiques de SIRT1 sur les HSR « Heat shock response » (Westerheide, 2009)

De façon intéressante, il a été montré que l'induction pharmacologique des HSPs pourrait constituer des traitements, comme cela a été montré chez la souris dans la maladie dystrophique musculaire de Duchenne, où l'augmentation intramusculaire de HSP72 induite par BGP-A5 (un inducteur pharmacologique de Hsp72) améliore cette pathologie dans deux modèles de souris (Gehrig, 2012).

1.2.1.6.2 Systèmes protéolytiques

Pour lutter contre la toxicité des protéines altérées non réparables qui représentent la majorité des protéines endommagées, le système lysosomal et le système protéasome dans le cytosol, et la Lon protéase dans la mitochondrie (Ugarte, 2010), assurent leur dégradation. Ce réseau impliqué dans la protéostasie, appelé « proteostasis network » et garant de l'homéostasie protéique, détecte les protéines altérées à l'intérieur de la cellule, coordonne leur conformation, leur réparation ou leur élimination par différentes voies protéolytiques, i.e protéasome, lysosome et autophagie. Le protéasome est impliqué principalement dans la dégradation des protéines anormales, oxydées et endommagées. De plus, la prise en charge rapide et précise d'une vaste étendue de protéines cellulaires par le système ubiquitin-protéasome (UPS) permet un contrôle étroit des fonctions cellulaires, telles que réparation de l'ADN, progression du cycle cellulaire, développement, apoptose, sénescence, réponse immune, métabolisme et le contrôle de la qualité des protéines (Baraibar et Friguet, 2012) (Figure 38).

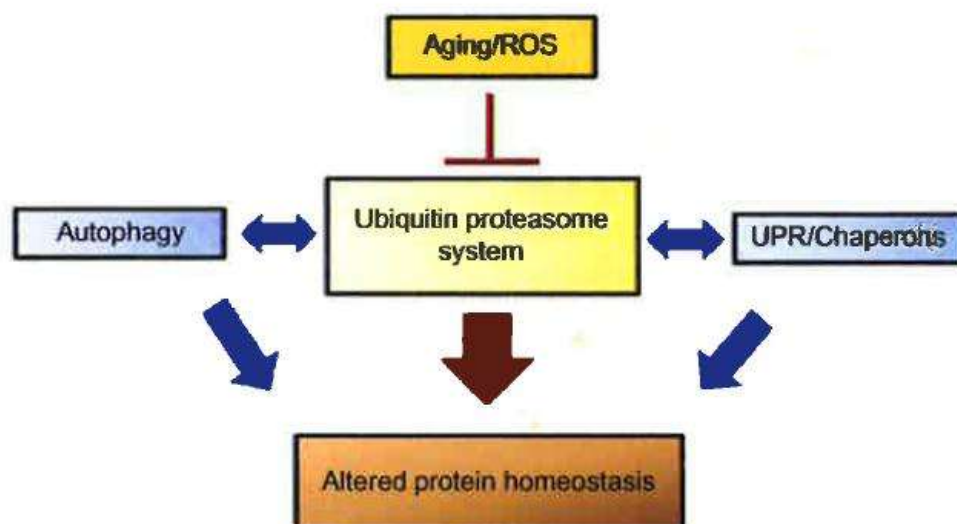


Figure 38 - Représentation schématique du « réseau protéostasie » au cours du vieillissement (Baraibar et Friguet, 2012)

Or, ces systèmes protéolytiques ainsi que d'autres systèmes impliqués dans la réparation des protéines oxydées, tels que des méthionines sulfoxide réductases (Msr), s'altèrent avec l'âge et pendant la sénescence répliative.

Remarque : Certaines études montrent que ce déclin pourrait ne pas être universel (Baraibar and Friguet 2013).

Le système protéasomal peut s'altérer de différentes façons. Par exemple, une diminution de certaines de ses sous-unités a été rapportée chez la souris (Huber, 2009), une dissociation de l'holocomplexe chez la drosophile (Vernace, 2007) et une diminution de la capacité protéolytique dans des tissus et organes âgés de mammifères (Chondrogianni et Gonos, 2005).

De façon intéressante, chez le rat taupe et les humains centenaires, des taux et une activité élevée du protéasome ont été décrits (Chondrogianni, 2000 ; Perez, 2009). A l'inverse, une diminution dans l'activité peptidase du protéasome a été observée dans des tissus âgés variés (foie, cœur, rétine...) chez *C.elegans*, la drosophile et les mammifères (Baraibar et Friguet, 2012). De plus, des études ex vivo sur lymphocytes, kératinocytes et fibroblastes humains, ainsi que des cultures primaires au cours de la sénescence répliative ont montré un déclin de l'activité (Baraibar et Friguet, 2012).

Certains travaux ont mis en évidence qu'il était possible d'augmenter l'activité du protéasome grâce à des inhibiteurs de déubiquitylase (par exemple, Usp14, une enzyme associée à la déubiquitination peut inhiber la dégradation de l'ubiquitine) qui accélèrent la dégradation de protéines oxydées dans des cultures de cellules humaines (Lee, 2010). Par ailleurs, l'activation de la signalisation EGF permet de rallonger la durée de vie chez les nématodes via l'augmentation de l'expression de divers composés de l'UPS « ubiquitin-proteasome system » (Liu, 2011).

En ce qui concerne l'autophagie, de nombreux travaux montrent d'une part que les protéines ATG ou autres protéines nécessaires pour l'induction de l'autophagie, telles que SIRT1, ont des expressions réduites dans les tissus âgés, et d'autre part une diminution de l'autophagie avec le vieillissement (Rubinsztajn, 2011) (**Figure 39 et Figure 40**).

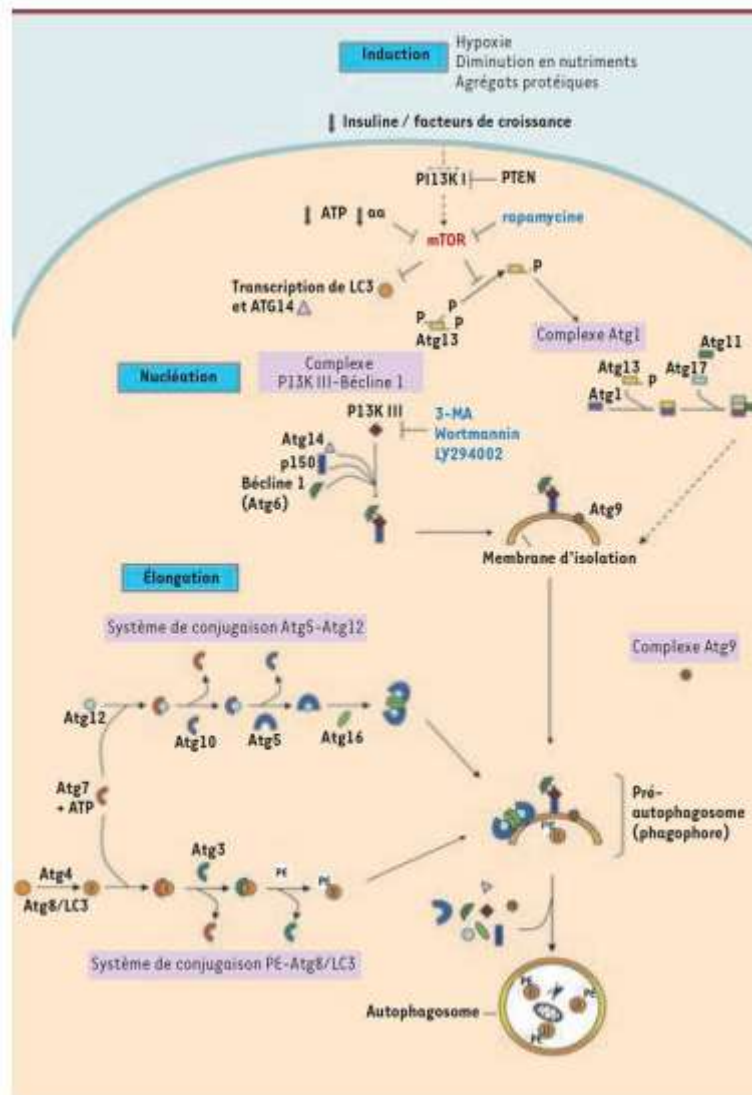


Figure 39 - Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'autophagosome et dans la régulation de l'autophagie (Puyal, 2009)

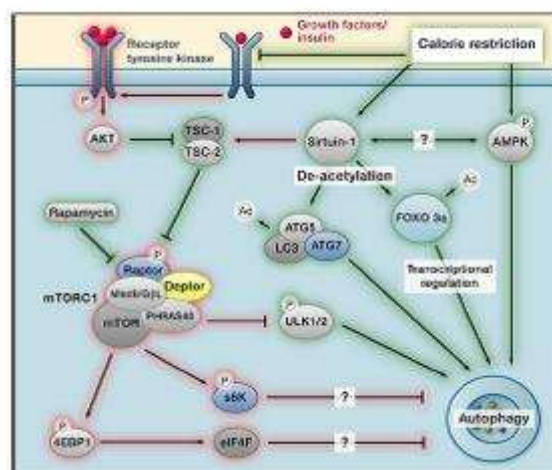


Figure 40 - Régulation de l'autophagie et longévité (Rubinsztain, 2011)

La perte de fonction due à des mutations de Atg1 (Unc-51), Atg7, Atg18 et Beclin (Bec-1) diminuent la durée de vie chez *C. elegans* et chez la drosophile (Toth, 2008 ; Lee, 2010). Chez la souris, la mutation au niveau des tissus de gènes ATG accélère les manifestations de marqueurs liés à l'âge, tels que l'inclusion intracellulaire de corps contenant des protéines ubiquitynylées, l'accumulation de lipofuscine dans les lysosomes, la désorganisation des mitochondries, l'oxydation des protéines conduisant à leur carbonylation, carboxymethylation ou nitrosylation (Rubinsztein, 2011). Zhang et Cuervo ont montré dans le foie de souris que le récepteur autophagique LAMP2a s'effondrait avec l'âge. La restauration du taux de LAMP2 permet de prévenir les altérations de la fonction hépatique liée à l'âge (Zhang et Cuervo, 2008). C'est aussi le cas dans le cerveau humain normal âgé, où on assiste à une diminution de Atg5, Atg7 and Beclin 1 (Lipinski, 2010).

La cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR) est un régulateur négatif primordial de l'autophagie, de la levure à l'homme (Rubinsztein, 2011). Quant à la restriction calorique, elle est le premier inducteur physiologique de l'autophagie (Levine et Kroemer, 2008) et l'inhibition de l'autophagie empêche les effets anti-âge de la RC chez *C. elegans*, la drosophile et la souris. De plus, la RC n'a plus d'effet sur la longévité quand la signalisation mTOR est déjà diminuée chez la levure, le ver nématode et la mouche, suggérant que des mécanismes communs existent entre ces deux voies. L'inhibition de mTOR, soit pharmacologiquement par la rapamycine, soit par des manipulations génétiques, augmente la durée de vie chez *C. elegans*, la drosophile et la souris (Rubinsztein, 2011).

Remarque : Bien que la rapamycine induise potentiellement l'autophagie, elle peut toutefois avoir un impact sur le vieillissement par sa capacité de réprimer les processus inflammatoires et auto-immuns (Kapahi, 2010). A noter qu'une autre molécule induisant l'autophagie, la spermidine, qui n'a pas d'effet immunosupresseur comparativement à la rapamycine, favorise l'allongement de la durée de vie chez la levure, la drosophile et C.elegans via l'induction de l'autophagie (Eisenberg, 2009).

De plus, l'effet de la rapamycine sur la longévité est strictement dépendant de l'induction de l'autophagie chez la souris (Rubinsztein, 2011). Un tel effet n'ayant pas été retrouvé chez l'homme, et le fait que l'inhibition de TORC1 ait des effets majeurs sur la traduction des protéines, cela soulève la question de savoir si c'est vraiment l'inhibition de mTOR qui améliore la longévité par l'induction de l'autophagie, ou bien si cet effet implique des effets indépendants de l'autophagie. Les effets de l'inhibition de mTOR s'expliquent par la phosphorylation de son substrat SK6 qui perd son activité kinase. Quand SK6 n'est pas exprimée, on observe une augmentation de la durée de vie chez *C. elegans*, la drosophile et la souris. Une délétion de SK6 conduit à une activation de l'AMPk et échoue dans l'augmentation de la longévité chez *C. elegans* déficient en AMPk. (Selman, 2009). Comme l'AMPk est un activateur potentiel de l'autophagie (Ravikumar, 2010), il reste à clarifier si c'est la délétion de SK6 qui cause l'autophagie et si l'autophagie pourrait contribuer à la longévité dans les modèles animaux déficients en SK6.

A la lumière des très nombreux travaux qui montrent que l'altération de l'homéostasie protéique est un événement important et précoce du vieillissement, que certains gènes codant pour les sous-unités de ce système sont impliqués dans la longévité, l'optimisation de

son fonctionnement semble être une voie prometteuse et une alternative à la prévention de l'apparition des protéines oxydées par des antioxydants. Cette voie est d'autant plus réaliste que de récentes manipulations génétiques ont montré qu'il était possible d'améliorer le fonctionnement de ce système ainsi que de rallonger la durée de vie chez les mammifères (Zhang et Cuervo, 2008).

1.2.1.7 Les cellules souches

Les cellules souches sont des unités fonctionnelles de croissance et de régénération car elles sont responsables du renouvellement naturel des tissus ou de leur réparation en cas de lésion (Wagers, 2012). Elles sont localisées dans un microenvironnement spécialisé, appelé niche, qui régule leur prolifération, leur mobilisation et leur différenciation. La niche les protège de la déplétion et d'une prolifération excessive. Les cellules souches de la niche sont dynamiques, constituent des unités fonctionnelles des organes et des tissus, et ont un rôle important dans le comportement des cellules souches (Singh, 2012). Tout au long de la vie, les cellules souches adultes sont soumises au stress environnemental et aux dommages intracellulaires, et leur nombre est affecté au cours du vieillissement. Dans certains tissus comme le sang, elles augmentent avec l'âge, alors que dans d'autres tissus, comme le cerveau et le muscle, elles diminuent (Pollina et Brunet, 2011).

Bien que dans un même tissu on puisse avoir des données discordantes, possiblement dues en partie aux conditions expérimentales qui diffèrent selon les études (isolation, quantification), **le déclin fonctionnel des cellules souches** (leur capacité à repeupler un tissu après une blessure, à proliférer en réponse à des stimuli extérieurs et à se différencier en plusieurs types cellulaires) **est commun à tous les compartiments de cellules souches adultes** (Pollina et Brunet, 2011).

Le déclin des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) et des cellules progénitrices avec l'âge a été bien documenté. Les HSCs isolées à partir de souris âgées montrent des déficits de mobilisation, une altération de la production et de la reconstitution du système immunitaire dans les études de transplantation, ainsi qu'une augmentation de l'incidence de cellules myéloïdes (Guerretaz, 2008 ; Shaw, 2010). Les études chez la souris âgée ont montré une décroissance du renouvellement cellulaire avec un moindre nombre de divisions cellulaires de HSCs âgés en comparaison à des HSCs jeunes (Rossi, 2007). Elle est associée à une accumulation des dommages de l'ADN dans les cellules âgées, pouvant ainsi contribuer à la diminution de la capacité des tissus âgés à maintenir un état d'homéostasie (Oh, 2014). Grâce à des modèles de transplantation de moelle osseuse chez la souris, Janzen et al ont montré que l'inhibition de p16NK-4a (gène codant pour un inhibiteur de kinase cycline-dépendante lié à la sénescence) pouvait améliorer la fonctionnalité des cellules souches et la réparation des tissus âgés (Janzen, 2006) **(Figure 41)**.

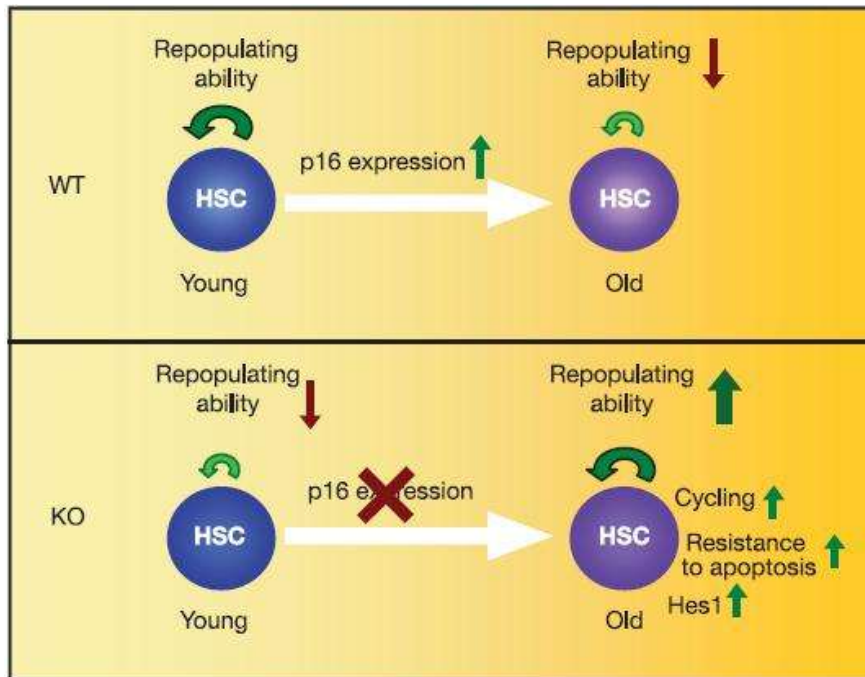


Figure 41 - p16NK-4a régule l'expression du gène Hes 1 associé au renouvellement des HSCs (Janzen, 2006)

Des altérations similaires des cellules souches sont aussi décrites dans les compartiments principaux des cellules souches de l'adulte au niveau de l'os (Gruber, 2006), des fibres musculaires (Cosgrove, 2014) et du système nerveux au niveau duquel la capacité à produire de nouveaux neurones diminue avec l'âge (Hattiangady et Shetty, 2008). Le déclin du nombre et de la fonction des cellules progénitrices, ainsi que leur capacité d'autorenouvellement dans la partie antérieure du cerveau de la souris, est là aussi corrélé à une augmentation de l'expression de p16NK-4a (Molofsky, 2006).

Par ailleurs, une prolifération excessive, associée à une diminution des capacités prolifératives de la niche, accélère aussi le vieillissement. Ainsi, l'état de quiescence (taux de prolifération faible) des cellules souches adultes est décrit comme un état garantissant la longévité des cellules souches. Dans ce sens, Kippin et al ont montré chez la souris que P21 (inhibiteur du cycle cellulaire) était un facteur important dans la maintenance des cellules souches et de leur autorenouvellement (Kippin, 2005). L'altération de la niche est associée à la diminution de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires et de facteurs qui contrôlent leur capacité de renouvellement chez la drosophile, *C. elegans* et la souris (Singh, 2012).

Ainsi, au cours du vieillissement, de nombreux facteurs intrinsèques irréversibles et extrinsèques conduisent (**Figure 42**) à un dysfonctionnement du nombre et de la fonction des cellules souches, avec pour conséquence une perte de l'homéostasie et de la capacité de régénération des tissus. De nombreux mécanismes et voies sont possiblement impliqués dans la régulation et la fonctionnalité des cellules souches (Oh, 2014) (**Figure 43**).

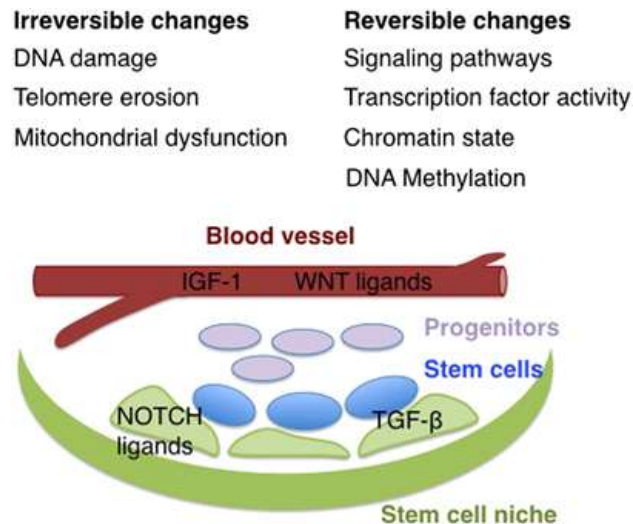


Figure 42 - Mécanismes du vieillissement des cellules souches (Pollina et Brunet, 2011)

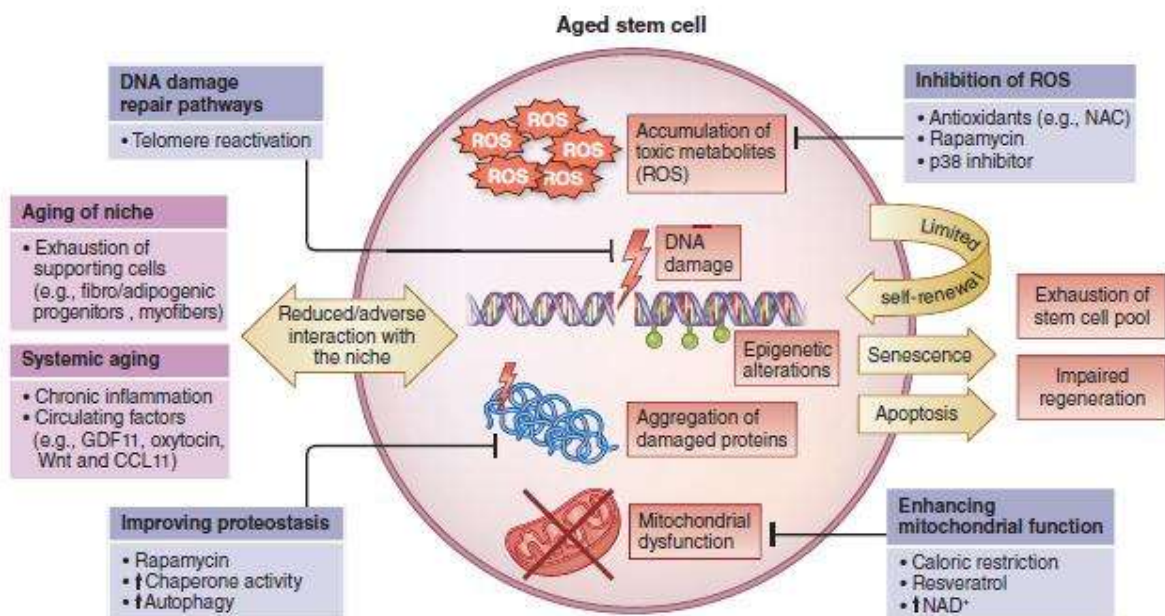


Figure 43 - Voies communes contribuant à la perte et au dysfonctionnement des cellules souches au cours du vieillissement (Oh, 2014)

En rouge (au niveau des cellules souches) ; en mauve (au niveau de la niche) ; en bleu (possible stratégie de réversion)

La contribution de l'importance des facteurs intrinsèques versus les facteurs extrinsèques dans le vieillissement est l'objet de débats, mais elle est très certainement très dépendante (Pollina et Brunet, 2011).

Par exemple, une transplantation de HSCs de donneurs âgés dans un environnement de receveurs jeunes n'a pas permis de réverser les effets de l'âge tels que l'augmentation du nombre de cellules souches et l'augmentation de biais comme les cellules myéloïdes (Pearce, 2007). De plus, l'accumulation des marqueurs des dommages de l'ADN dans les HSCs âgés et les altérations de fonctionnalité dans les HSC de souris transgéniques (mutations des voies de réparation de l'ADN) suggèrent que les dommages de l'ADN sont des contributeurs majeurs du vieillissement des cellules souches (Nijnik, 2007).

Remarque : Des sous-catégories de clones peuvent répondre de façon différente à TGF β 1, un facteur important dans la signalisation, soit en stimulant des clones myéloïdes, soit en inhibant des clones lymphoïdes, indiquant ainsi que les mécanismes contrôlant l'expansion clonale sont régulés par l'environnement (Challen, 2010).

Par ailleurs, dans d'autres tissus comme le **muscle ou le cerveau**, la fonction des cellules souches adultes est très influencée par des facteurs environnementaux suggérant que les modifications liées à l'âge sont réversibles dans ces tissus. La réversibilité des défauts liés à l'âge dans les cellules musculaires a été montrée grâce à des expériences de parabiose dans lesquelles les systèmes circulatoires des animaux jeunes et âgés sont joints. Les facteurs sanguins circulants de souris jeunes peuvent restaurer la voie de signalisation NOTCH et le potentiel prolifératif des cellules souches de souris âgées (Conboy, 2005). Chez l'homme, les défauts de prolifération des cellules musculaires peuvent aussi être partiellement éliminés quand elles sont cultivées en présence d'inhibiteurs de la voie NOTCH (Carlson, 2009). Plus récemment, Lavasani et al ont montré que la transplantation de cellules musculaires de souris jeunes à des souris progéroïdes rallonge la durée de vie et améliore les aspects dégénératifs, même dans les tissus dans lesquels les cellules des donneurs ne sont pas détectées, suggérant que les effets thérapeutiques pourraient être systémiques issus de facteurs sécrétoires (Lavasani, 2012).

D'autres facteurs systémiques peuvent réguler de façon réversible la fonction des cellules souches au cours du vieillissement, incluant des cytokines et des hormones de stress (Pollina et Brunet, 2011). Par exemple, la voie de signalisation mTOR intervient dans la régulation de l'autorenouvellement et la différenciation des cellules HSCs (Laplante et Sabatini, 2012). Quant à l'équipe de Yilmaz, elle a montré que la préservation des cellules souches intestinales était possible grâce à la RC directement liée à l'inhibition de mTOR (Yilmaz, 2012). Cerletti et al ont aussi montré que la RC augmentait le pouvoir régénératif des cellules souches musculaires, tant chez des souris jeunes que chez des souris âgées. Ces études suggèrent qu'une RC court terme et/ou des composants tels que la Rapamycine qui ciblent mTORC1 pourraient améliorer l'efficacité des traitements thérapeutiques avec les cellules souches. Des drogues dérivées de la Rapamycine sont déjà utilisées pour prévenir le rejet chez des patients transplantés après une angioplastie (une procédure chirurgicale pour réparer ou déboucher un vaisseau sanguin) ou dans le traitement de certaines formes de cancer (Ramos et Kaeberlain, 2012).

Toutefois, ces études ayant été menées sur des temps relativement courts, on peut se demander si un régime dès le jeune âge pourrait protéger ou prévenir des maladies liées à l'âge.

Enfin, il est intéressant de noter la découverte récente d'une nouvelle cible de rajeunissement pharmacologique. En effet, grâce à l'inhibition d'une RhoGTPase, CDC 42, dont l'activité augmente dans les cellules HSCs âgées, il est possible de rajeunir des cellules humaines sénescents (Florian, 2012).

1.2.1.8 Sénescence

La sénescence cellulaire peut être définie comme un processus qui induit un arrêt essentiellement irréversible du cycle associé à d'importants changements morphologiques et physiologiques (Kuilman, 2010). L. Hayflick a introduit pour la première fois le terme de sénescence après avoir découvert que les cellules somatiques cessent de proliférer après un nombre précis de divisions en culture. Il a associé intuitivement cette notion de sénescence, d'une part à celle de cancer car pour échapper à la sénescence les cellules doivent acquérir certaines caractéristiques de cancer, et d'autre part à celle du vieillissement car l'accumulation de cellules sénescents contribue au vieillissement global de l'organisme (Hayflick, 1965). Plus tard, il a été proposé **que l'érosion des télomères** des cellules somatiques au cours des divisions et de la réplication des chromosomes **était reconnue comme de l'ADN endommagé** et pouvait activer la réponse au stress génotoxique (identique à celle qu'induisent les rayonnements ionisants) et conduire à l'arrêt de la division cellulaire, d'où le nom de sénescence répllicative (Brondello, 2012). Au niveau des organes, les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus âgés (Campisi, 2005) se sont révélées être un facteur causal des désordres liés à l'âge car leur déplétion retarde le début de ces altérations (Baker, 2011). Par ailleurs, de nombreuses études ont renforcé l'importance du rôle de la sénescence en tant que barrière oncosuppressive (Serrano, 1997).

En plus du raccourcissement des télomères, d'autres stress associés au processus de tumorigénisation ont été rapportés comme des **lésions de l'ADN et les ROS**. Ces derniers partagent, avec l'altération des télomères, l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN (en anglais, « DNA damage response » ou « DDR »), une voie de signalisation par laquelle les kinases ATM ou ATR bloquent l'activation de CDK (cyclin-dépendant kinase) contrôlant la réplication de l'ADN et la mitose. Des travaux sur fibroblastes humains sénescents ont montré une accumulation de foyers de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX), un marqueur de sites de cassures de l'ADN, ainsi que d'autres protéines intervenant dans la réparation de l'ADN (53PBI, ARM, BMCRI...) (Gire, 2005) **(Figure 44)**. Cette voie de signalisation conduit, via la stabilisation de p53, à l'induction de p21, un inhibiteur de CDK. L'inactivation de CDK2 empêche l'inactivation de pRb ou RB (protéine de rétinoblastome), ce qui assure l'irréversibilité de l'arrêt du cycle. Ainsi, l'axe p21-pRb joue un rôle crucial dans l'induction de la sénescence. D'ailleurs, on a montré, à partir de cultures cellulaires de fibroblastes humains, que l'absence de RB pouvait conduire à une instabilité génomique (Chicas, 2010). **Ces deux suppresseurs de tumeurs, pRB et P53, dont les voies moléculaires sont altérées dans la quasi-totalité des cellules cancéreuses, sont des acteurs-clés de la réponse génotoxique et de l'arrêt de la prolifération cellulaire (Figure 45 et Figure 43).**

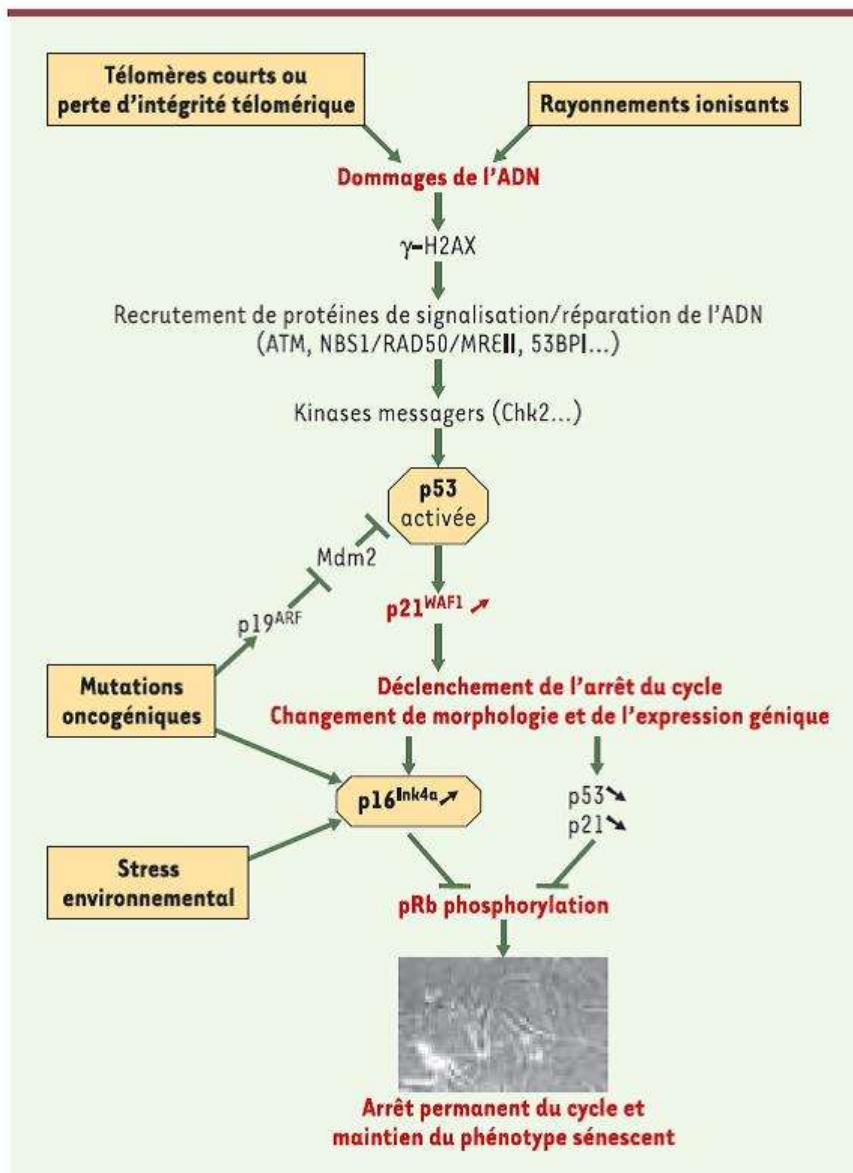


Figure 44 - Mécanismes à la base de l'arrêt permanent du cycle cellulaire lors de la sénescence (Gire, 2005)

Par ailleurs, chez l'homme, **l'expression supra physiologique d'oncogènes activés** comme Myc, Ras ou Raf implique p19 et p16 qui inhibent CDK4 et CDK6 (K4/K6) dont la cible principale est pRB à l'instar de p21 (Brondello, 2012 ; van Deursen, 2014) (Figure 45).

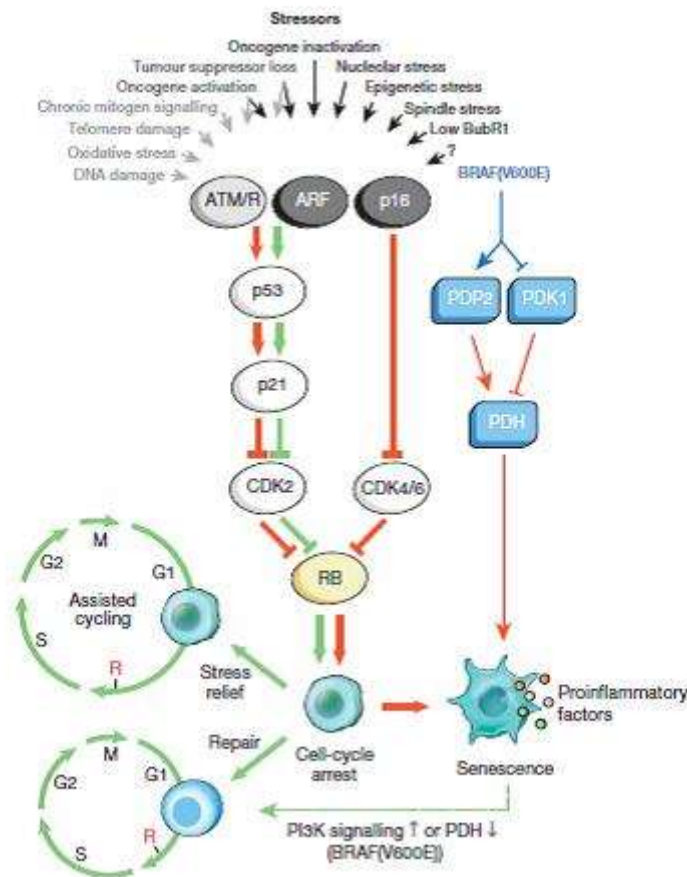


Figure 45 - Stimuli de sénescence et principales voies de signalisation (van Deursen, 2014)

Flèches rouges : induction de sénescence- Flèches vertes : prévention de sénescence- Flèches vertes en pointillées : mécanismes de réversion.

Remarque: La contribution de p16 à l'arrêt du cycle cellulaire reste incertaine (Herbig, 2004) et les mécanismes de son activation au cours de la sénescence ne sont pas complètement établis.

Les gènes p16 et p19 sont portés par un même locus INK4a/ARF qui est génétiquement associé au plus grand nombre de pathologies liées à l'âge (maladies cardiovasculaires, diabète, maladie d'Alzheimer et glaucome) (Jeck, 2012). Le gène codant pour ARF, un autre suppresseur de tumeur tout comme p16, est inactif dans les cellules en prolifération, suggérant une corégulation des gènes du locus. Des données récentes ont montré que la répression épigénétique de ce locus par les protéines du groupe Polycomb, dont BMI1, est levée en réponse à un stress oncogénique (Kuilman, 2010). De même, l'expression protéique de p16 et BMI1 est aussi coréglée par les microARN, dont le rôle dans la sénescence pourrait être essentiel (Smith-Vikos et Slack, 2012).

Au final, le rôle critique de p16 et p53 en tant qu'inducteurs de sénescence impliqués dans le vieillissement physiologique semble être tout à fait acceptable au regard de leurs bénéfices en tant que suppresseurs de tumeur. Dans un modèle de souris mutées (souris HGPS-Hutchison-Gilford Progeria syndrome) présentant un vieillissement prématuré (Varela, 2005) et une extension des dommages liés à la sénescence, l'élimination de p16 ou p53 est associée à une amélioration de leur phénotype.

Remarque : La situation n'est pas si simple car d'autres données sont en contradiction avec ces observations. Par exemple, l'élimination de p53 peut aggraver le phénotype de certaines souris présentant un vieillissement précoce (Ruzankina, 2009).

Bien que les voies p53-p21 et p16-RB dépendent du type de stress, toutes deux conduisent de façon ultime à la sénescence. De façon intéressante, si les dommages de l'ADN induisent l'arrêt de la progression du cycle via p53-p21, la persistance des lésions quant à elles peuvent induire l'activation de p16 via p38-MAPK résultant du dysfonctionnement mitochondrial et de la production de ROS (Freund, 2011).

D'autres inducteurs de sénescence moins largement étudiés incluent des stress épigénétiques, nucléaires etc. (van Deursen, 2014). In fine, pour mieux comprendre les mécanismes et les voies métaboliques activées, il sera nécessaire d'étudier plusieurs types de stress (génotoxiques, protéotoxiques...) pour caractériser plus précisément les phénotypes associés à la sénescence.

Mieux encore, si aujourd'hui la sénescence est reconnue comme un mécanisme suppresseur de tumeur in vivo, son irréversibilité est un sujet de débat. La sénescence induite par stress oxydatif (via un mécanisme métabolique comprenant la stimulation de l'expression de la PDH-pyruvate déshydrogénase-mitochondriale en favorisant le passage de la glycolyse à la phosphorylation oxydative) peut être réversée par activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ou l'inhibition de PDH (Vredelvel, 2012, Kaplon, 2013). De plus, des cellules sénescents peuvent être dédifférenciées en cellules souches pluripotentes (Lapasset, 2011).

Remarque : Des différences inter-espèces existent. Par exemple, le rôle d'ARF (alternative reading frame) dans la sénescence n'a été démontré que dans le modèle murin (Brondello, 2012). De plus, dans ce modèle, les voies de sénescence sont plus dépendantes de p19 que celles de la sénescence dans les cellules humaines (van Deursen, 2014).

Enfin, la compréhension des mécanismes du passage in vitro à in vivo n'est pas encore très bien étudiée. En effet, il existe des contrastes entre les données vitro et vivo comme, par exemple p19, p53 et p21 qui préviennent la sénescence in vivo ainsi que certaines pathologies liées à l'âge (Baker, 2013).

Ces données ont conduit au **concept de « cycle assisté »** proposé par van Deursen pour décrire ce phénomène par lequel les cellules exposées à des dommages modérés peuvent être réparées, ou alors, si les dommages sont chroniques, le cycle des cellules peut être rallongé en attendant la mise en place de mécanismes de réparation compensatoires (Figure 45-flèches vertes) (van Deursen, 2014). Bien qu'il ait été observé que des cycles cellulaires rallongeaient au fur et à mesure des passages sur cultures primaires de fibroblastes (Grove, 1977), ce qui peut soutenir en partie ce concept, ce dernier nécessite une validation et une généralisation.

Jusqu'à récemment, la sénescence était considérée comme une phase statique. Cependant, plusieurs observations confortent l'hypothèse que la sénescence peut être un **processus dynamique**, impliquant plusieurs étapes au cours desquelles les propriétés des cellules

sénescentes évoluent et se diversifient. Dans cette hypothèse, l'étape initiale serait caractérisée par le passage d'un arrêt temporaire du cycle à un arrêt stable avec une inhibition prolongée de l'activité Cdk par p16 et/ou p21 (van Deursen, 2014) (**Figure 46**). De même, un changement dans l'expression de p53 passant d'une expression intermittente à prolongée semble être un événement crucial dans la transition du passage de l'arrêt transitoire du cycle à un arrêt permanent (Purvis, 2012).

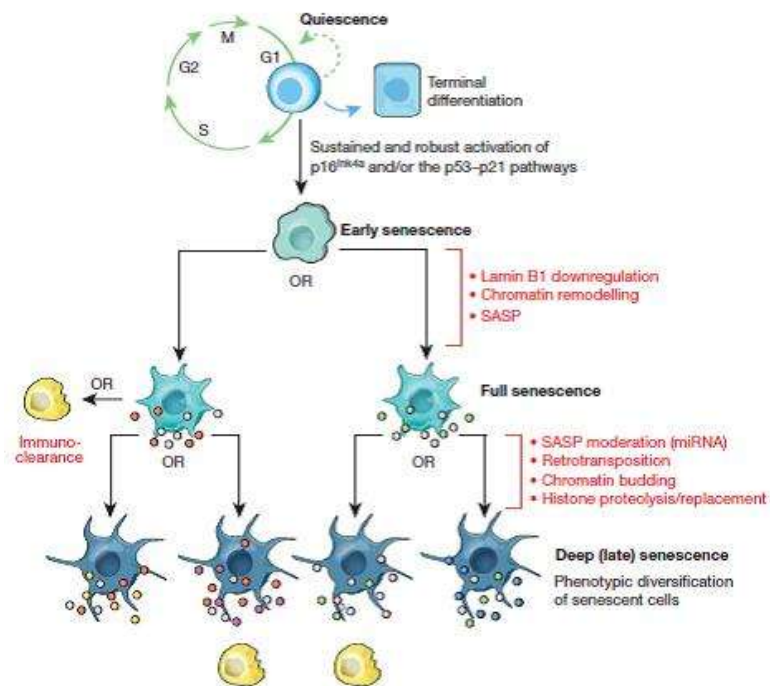


Figure 46 - Hypothèse d'un modèle de sénescence selon plusieurs étapes (van Deursen, 2014)

Après l'induction de la sénescence, des changements importants de la chromatine accompagnent l'arrêt du cycle. La structure chromatinienne est remodelée profondément et on peut observer des foyers nucléaires qui contiennent de l'hétérochromatine facultative et sont appelés SAHF (senescence-associated heterochromatic foci). Cette réorganisation globale de la chromatine, qui est dépendante de pRb, jouerait un rôle essentiel dans le programme de sénescence et la pérennisation de l'état sénescence (Kuilman, 2010). Les modifications de la chromatine aboutissent à des changements importants au niveau de la transcription. On notera une stimulation importante d'un large sous-groupe de gènes codant pour des cytokines (IL6 et IL8) et des chémokines aux propriétés inflammatoires, ainsi que des facteurs de croissance et des protéases qui altèrent la structure et la fonction des tissus. Ce sécrétome spécifique ou SASP, (senescence-associated secretory phenotype) est une des caractéristiques-clé qui distingue les cellules sénescence des cellules quiescentes et qui joue un rôle important dans la réponse inflammatoire. En effet, l'inhibition d'IL6 ou la déplétion du récepteur de l'IL-8 dans les cellules sénescence provoque un effondrement global du réseau inflammatoire et supprime la sénescence (Kuilman, 2010).

Remarque: L'accumulation de cellules sénescences ne s'accompagne pas toujours par d'une infiltration de cellules immunes et d'inflammation, comme cela a été rapporté dans les naevi mélanocytaires (Benz, 1991).

Des mécanismes additionnels et des voies de signalisation sont aussi associés à la sénescence, tels que l'autophagie qui augmenterait la réponse au stress en contribuant à l'arrêt du cycle cellulaire et en participant à la survie des cellules sénescences (Young et Narita, 2010). Elle pourrait être un effecteur de la sénescence car elle est requise pour la sécrétion d'IL6 et IL8. Par ailleurs, **mTOR pourrait aussi contribuer au processus de sénescence** en stimulant SASP et l'autophagie limitée à un compartiment associé à l'appareil de Golgi (Narita, 2011), ce qui pourrait expliquer le rôle délétère de mTOR dans le vieillissement si ces observations sont validées par d'autres expériences.

Remarque: La sénescence étant impliquée dans des processus variés, tels que le développement embryonnaire, la cicatrisation, la réparation des tissus, le cancer et le vieillissement, on peut se demander si les cellules sénescences ont des propriétés fondamentalement différentes, quels sont les mécanismes cellulaires associés à la sénescence et quelles sont les différences de cinétique de ce processus?

Dans le cas du vieillissement, avec l'accumulation des dommages, les cellules pourraient devenir de plus en plus dépendantes des points de contrôle de cycle cellulaire pour conserver leur potentiel prolifératif. L'induction d'une sénescence chronique se produirait après des périodes de stress cellulaire ou de dommages progressifs jusqu'à un arrêt stable. Ainsi, la sénescence chronique non programmée ne semble pas cibler des types cellulaires spécifiques. Il est concevable qu'avec l'âge, l'immunodéficiência ou la production moindre de SASPs sont associées à une élimination inefficace des cellules sénescences chroniques et permettraient ainsi un processus de sénescence en plusieurs étapes. Dans le cas de la sénescence induite pendant le traitement des cancers, elle pourrait être d'abord aiguë, puis de nature chronique (van Deursen, 2014) (**Figure 47**).

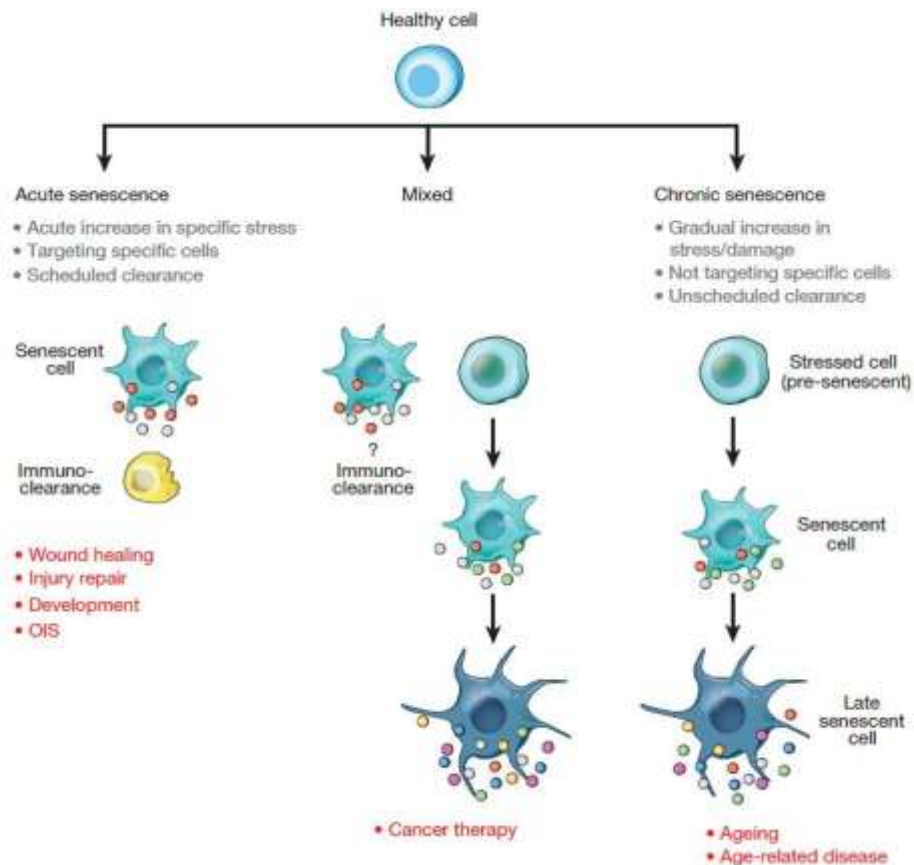


Figure 47 - Cellules sénescences aiguës et chroniques (van Deursen, 2014)

En conclusion, si la sénescence est reconnue comme un mécanisme pertinent *in vivo*, il n'en reste pas moins que ses liens avec le vieillissement et le cancer ont été identifiés *in vitro* et dans des modèles animaux car ils sont difficiles à démontrer chez l'homme.

La sénescence présente un véritable caractère ambivalent en contribuant à la suppression tumorale et à la cicatrisation, mais aussi en participant au vieillissement et aux pathologies associées à l'âge. L'effet délétère de la sénescence n'apparaîtrait que plus tard dans la vie, notamment parce qu'elle intervient, via l'induction de p16, dans la déplétion des cellules souches, favorisant ainsi l'altération de l'homéostasie tissulaire et conduisant au vieillissement dans les modèles murins (Brondello, 2012).

Cette ambivalence est donc bien illustrée par p16, un de ses acteurs-clés. Alors que la répression de p16 caractérise de nombreuses tumeurs, son invalidation permet d'accroître des cellules souches tissulaires et donc, potentiellement, la durée de vie. Par ailleurs, si on considère qu'une stimulation modérée de la sénescence induisant une suppression de tumeur peut augmenter la longévité (Matheu, 2007), alors que l'élimination de cellules sénescences dans un modèle expérimental associé à la progeria retarde les pathologies liées au vieillissement (Baker, 2011), un véritable défi reste encore à relever pour caractériser la sénescence afin d'offrir des approches adaptées pour améliorer les conditions de vie liées au vieillissement.

1.2.1.9 Altération de la communication intercellulaire

Alors que nous venons de voir qu'au niveau cellulaire le vieillissement fait souvent référence à la sénescence, chez les organismes multicellulaires le vieillissement est caractérisé par des détériorations fonctionnelles au niveau des organes et des tissus. Par exemple, le vieillissement du système vasculaire implique, en plus des mécanismes cellulaires autonomes, des voies de signalisation neuro-hormonales (adrénergique, insulino-IGF1 par exemple) (Dai, 2012).

Grâce à des manipulations de l'hypothalamus dans des modèles de souris, Zhang et al ont montré que la région medio-basale de l'hypothalamus (MBH) était sensible aux perturbations modérées mais chroniques, telles que l'excès calorique qui peut conduire à des **modifications moléculaires inflammatoires**. De plus, ces altérations inflammatoires au niveau de la région MBH peuvent altérer la régulation de l'équilibre énergétique et contribuer à la progression du déséquilibre du poids du corps, à l'obésité et aux désordres métaboliques qui les accompagnent (Zhang, 2008). En outre, l'inflammation est impliquée dans la pathogénicité de l'obésité et du diabète de type 2, deux conditions qui favorisent le vieillissement et qui lui sont corrélées (Kleemann et Bucala, 2010). D'autres travaux de la même équipe ont montré que l'avancement dans l'âge est caractérisé par une **activation chronique de la voie IKKB/ NF-κB** (dépendante de la réaction de l'immunité innée), principalement au niveau de l'hypothalamus. L'inhibition de IKKB/ NF-κB, soit dans la microglie, soit dans les neurones de la région MBH, permet de retarder le vieillissement et de rallonger la durée de vie (Zhang, 2013). Dans la même étude, les auteurs rapportent que l'activation de IKKB/NF-κB inhibe la production de l'hormone gonadotrophine (GnRH), ce qui peut expliquer le déclin de cette hormone avec l'âge. Un traitement avec la GnRH a permis d'améliorer les nombreux effets dus à l'âge, tels que l'atrophie de la peau, la faiblesse musculaire et la perte osseuse. L'ensemble de ces résultats soulignent le rôle central de l'hypothalamus dans la coordination du vieillissement de l'ensemble du corps (Zhang, 2013). Il est aussi connu que l'inflammation provoque l'athérosclérose en aggravant la pathologie au niveau du système vasculaire (Csiszar, 2003).

Depuis les années 2000, le concept « d'Inflamm-ageing » propose que le vieillissement physiologique soit la conséquence d'une inflammation chronique au niveau des organes, à la suite d'une production basale excessive de médiateurs proinflammatoires (cytokines, facteurs de coagulation...) par des cellules immunes ou non immunes (Franceschi, 2000). L'augmentation des taux systémiques de cytokines active l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien qui augmente la sécrétion de cortisol (Giunta, 2008), puissant agent anti-inflammatoire, qui non seulement induit le catabolisme des protéines, mais aussi favorise la résorption de l'os. De façon intéressante le processus de vieillissement est simultanément accompagné par deux forces opposées : l'accélération de l'inflammaging et « l'anti-inflammaging » (Franceschi, 2007). Ce serait l'équilibre entre ces deux forces opposées qui pourrait contrôler et orienter le processus du vieillissement, soit vers un affaiblissement des

organes et le déclenchement de maladies dégénératives, soit vers une augmentation de la longévité et une bonne santé.

De récentes études ont clairement indiqué que la production de ROS induite par les mitochondries endommagées pouvait stimuler un ensemble de protéines intracellulaires appelés inflammasomes, les récepteurs NOD (Nucleotid-binding oligomerization Domain proteins). En particulier, NLRP3 peut être activé par de nombreux signaux de stress cellulaire impliqués dans le vieillissement, tels que les ROS, la cathepsine B relarguée par les lysosomes déstabilisés et les agrégats de protéines. Puis NLRP3 active les caspases, principalement la caspase-1, qui clive les précurseurs inactifs d'IL-1 β et IL-18 et stimule leur sécrétion. **Au final, ces cytokines provoquent la réponse inflammatoire et accélèrent le processus du vieillissement en inhibant l'autophagie** (Salminen, 2012) (Figure 48).

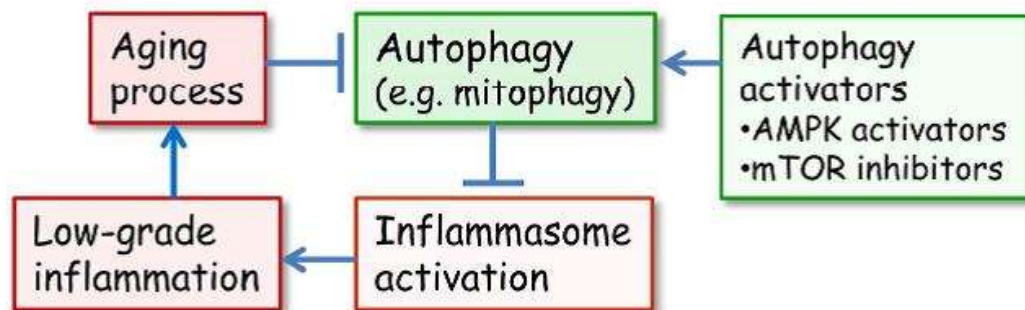


Figure 48 - Interaction entre autophagie et inflammasome dans la génération de l'inflammaging (Salminen, 2012)

De façon intéressante, d'autres études ont aussi permis de montrer **un lien entre les maladies inflammatoires, l'augmentation de l'érosion de l'ADN et la signalisation des dommages à l'ADN** (Sahin et Depinho, 2010). A cet égard, une **déficiencia d'AUF1** chez la souris (un régulateur de la stabilité des ARNm codant pour les cytokines) provoque une augmentation de prurit au niveau de la peau qui est dans un état inflammatoire (Sadri et Schneider, 2009). Les données récentes de Pont et al, permettent aujourd'hui d'aller plus loin dans la compréhension du rôle pivotale de ce marqueur dans le vieillissement physiologique, puisque, en plus d'être bien établi en tant que facteur intrinsèque pour atténuer l'inflammation, il prévient aussi le développement de la sénescence cellulaire ainsi que l'érosion des télomères (Pont, 2012).

De façon similaire, un autre marqueur, la **sirtuine 1**, connu pour son rôle dans la régulation des processus de sénescence, de résistance au stress, du métabolisme et de l'apoptose, jouerait aussi un rôle dans la **régulation de l'inflammation**. SIRT1 conduit à la répression de la transcription de gènes variés en lien avec l'inflammation via la déacétylation des histones nucléosomales et **de facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1** (activator protein 1) et p53, par exemple. En accord avec ces données, chez la souris, la baisse des taux de SIRT1 s'avère être corrélée avec le développement de nombreuses maladies inflammatoires et son

activation pharmacologique aurait un rôle pivot dans la limitation de la réponse inflammatoire. Par ailleurs, d'autres membres de la famille des sirtuines, SIRT2, SIRT3 et SIRT7, semblent aussi jouer un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire (Xie, 2013 ; Hwang, 2013).

En relation avec **NF- κ B**, des auteurs ont identifié, par une approche bioinformatique, des combinaisons de motifs d'éléments cis-régulation (régions promotrices) qui régulent des gènes liés à l'âge dans différents tissus chez la souris et chez l'homme. Parmi ces motifs, le facteur de transcription NF- κ B était à la fois le plus largement impliqué et le plus fortement corrélé avec l'âge. En bloquant NF- κ B, ils ont montré le caractère réversible de certaines caractéristiques de l'âge (Adler, 2007) (**Figure 49**).

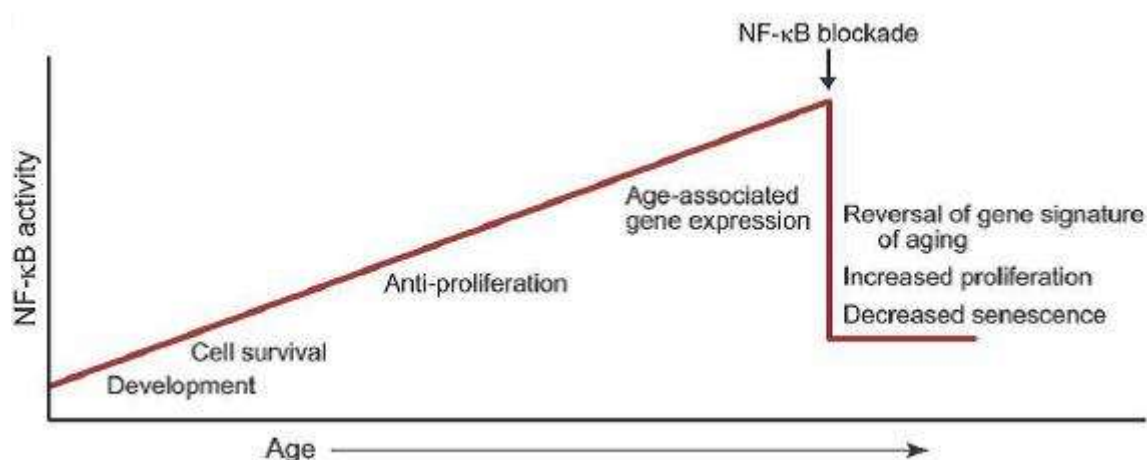


Figure 49 - Modèle de l'action de NF- κ B au cours du vieillissement (Adler, 2008)

NF- κ B est un régulateur majeur du programme de l'expression des gènes associée au vieillissement chez les mammifères.

Parallèlement à l'inflammaging, l'immuno-sénescence, qui caractérise l'incapacité du système immunitaire à développer une réponse immune, aurait aussi un impact majeur sur l'émergence de maladies chroniques comme l'athérosclérose, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Castelo-Branco et Soveral, 2014). Le déclin de l'immunité au niveau systémique aggrave le caractère phénotypique du vieillissement dans la mesure où l'une des fonctions de ce système est d'éliminer les cellules sénescents (Sagiv, 2013), les cellules hyperploïdes accumulées dans les tissus et les lésions prémaligènes (Senovilla, 2013).

Par ailleurs, si l'immunosénescence affecte les cellules CD4 chez la souris, le microenvironnement joue aussi un rôle dans les altérations fonctionnelles de ces cellules chez la souris (Lefebvre, 2012).

D'autres événements peuvent contribuer à la dégradation de l'environnement cellulaire. C'est le cas des cellules sénescents qui induisent la sénescence des cellules voisines via les gaps junctions permettant d'établir un contact entre elles. Les cellules sénescents produisent et sécrètent une variété de molécules, telles que les ROS, des interleukines pro-inflammatoires,

des protéines variées de liaison à IGF, qui peuvent toutes maintenir ou induire la sénescence d'une manière autonome ou pas. Par exemple, des cellules sénescents peuvent induire une réponse des dommages à l'ADN caractéristique de la sénescence chez les cellules voisines via les gaps jonctions, et des cellules sénescents peuvent induire la sénescence de fibroblastes témoins (Nelson, 2012) (**Figure 50**).

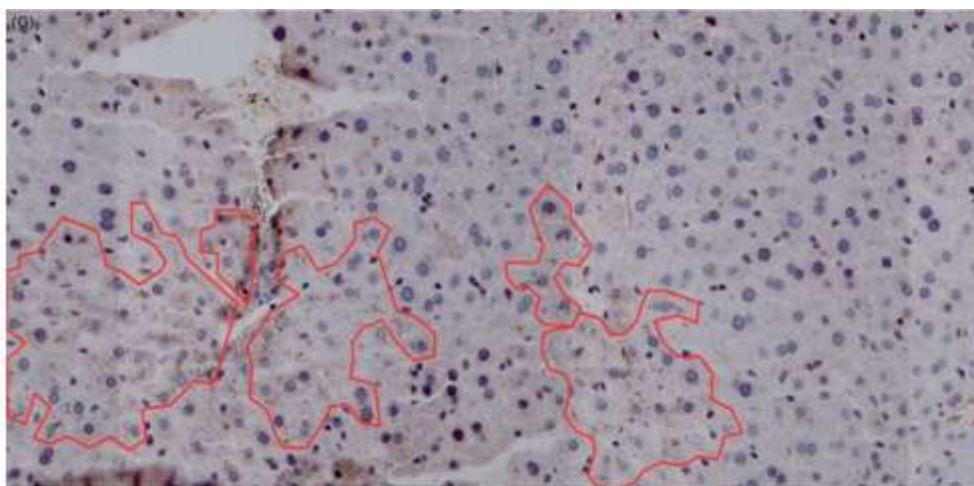


Figure 50 - Les cellules sénescents induisent la sénescence dans leur voisinage (Nelson, 2012).

Image représentation du foie de souris (âgée de 9 mois) avec les foyers 4-HNE (marqueurs de sénescence) entourés en rouge. Réponse des dommages à l'ADN.

Enfin, le processus du vieillissement affecte la composition du microbiome et son interaction avec le système immunitaire. Bien qu'il existe encore peu de travaux dans ce domaine, des modifications du microbiote intestinal peuvent être associées à l'immunosénescence et l'inflammaging dans une sorte de boucle autonome qui permet de considérer le déséquilibre du microbiote de l'intestin parmi les causes et les effets du processus inflammatoire au cours du vieillissement (Biagi, 2013). De très récents travaux ont aussi montré le lien entre le microbiome oral et la maladie d'Alzheimer. Les auteurs font l'hypothèse que, pour certains patients atteints de cette maladie, le processus favorise une production démesurée de bactéries orales anaérobies tôt dans la vie, provoquant une réponse inflammatoire qui affaiblit la barrière entre le sang et le cerveau qui permet aux bactéries de se propager et de favoriser la pathogénicité de l'AD (Shoemark, 2015).

Ainsi, l'étude de la composition du microbiome combiné à des facteurs génétiques pourrait améliorer la capacité d'évaluer le risque lié à certaines maladies et offrir de nouvelles opportunités pour la recherche dans la prévention et le traitement de maladies.

Tous les dommages liés au vieillissement que nous venons de décrire dans cette première partie ont été étudiés à partir d'une grande **variété d'approches et de modèles** s'adressant majoritairement aux organes, tels que le système nerveux central, le muscle, le foie, les intestins et le cœur. Pour terminer ce chapitre, nous proposons de faire un focus sur les mécanismes associés au vieillissement de la peau et du cheveu.

1.3 CAUSES ET /OU CONSEQUENCES DU VIEILLISSEMENT DANS LA PEAU ET LE CHEVEU

1.3.1 Vieillessement intrinsèque et extrinsèque

Le vieillissement cutané est un processus physiologique complexe qui s'accompagne, au niveau de la peau, de modifications morphologiques sous l'action combinée de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Avec l'âge, la qualité de l'architecture de la peau se détériore sous l'action des effets cumulés de facteurs d'origine interne et externe.

Le **vieillessement chronologique** est un **processus naturel** auquel participe une **carence hormonale** et où la part de la composante génétique impliquée dans la longévité est estimée à 25% (Ljungquist, 1998). A ce jour, le vieillissement hormonal de la peau est considéré comme étant uniquement dû à la carence œstrogénique, car il n'existe pas d'études prouvant le rôle de la carence en progestérone dans le vieillissement cutané. Le vieillissement chronologique se caractérise principalement par des altérations fonctionnelles plutôt que morphologiques. Cliniquement, il se manifeste par un **teint terne, une peau sèche, des ridules présentant un certain degré de relâchement et une variété de néoplasmes bénins** (Yaar, 2002). Plus occasionnellement, ces ridules sont associées à des rides d'expression (rides du front, rides de la patte d'oie et du sillon-nasogénien) induites par les mouvements naturels répétés du visage. **C'est surtout au-delà de l'âge de 70 ans que les rides deviennent visibles** (Lavker, 1987).

A ce processus naturel s'ajoute le **vieillessement extrinsèque** influencé par des facteurs environnementaux, les plus connus étant la pollution atmosphérique, la consommation de tabac, l'abus d'alcool et la malnutrition avec **prédominance du soleil**. En effet, ce sont les UVA, UVB et infrarouges qui accentuent les dommages causés à la peau. Au niveau des zones chroniquement exposées au soleil, les UVA, UVB et IR accélèrent les dommages de la peau et entraînent des manifestations autres que le vieillissement naturel : on parle alors d'héliodermie. On estime que **l'exposition aux UV est responsable de 80% des signes visibles du vieillissement** sur le visage, la zone la plus exposée du corps humain (Flament, 2013). Sur cette zone, les signes cliniques de l'âge peuvent être associés à la fois à la sécheresse, à l'apparition de rides, de désordres vasculaires, d'hétérogénéité de la couleur de la peau (de Rigal, 2010), de taches pigmentaires bien visibles à la surface du visage et de modifications topographiques en trois dimensions des structures plus profondes de la peau. Ces modifications, à la fois structurelles et fonctionnelles, reflètent l'effet combiné de la gravité, de la résorption osseuse progressive et de la flaccidité (avec une ptose du bas du visage et un relâchement du cou), ainsi que d'une diminution de l'élasticité, de la fermeté (Escoffier, 1988) et de la redistribution du tissu grasseux sous-cutané (Coleman et Grover, 2006).

Quant au **photo-vieillessement**, il dépend du type de peau des individus et du degré des dommages provoqués par l'environnement. Parmi les signes les plus visibles et les plus spécifiques de ces effets, on notera les **taches pigmentaires** qui sont largement décrites dans la littérature (Baumann, 2007). Selon Griffiths, le photovieillessement est caractérisé principalement par **des rides à la fois fines et profondes**, ce qui souligne la difficulté de caractériser ce paramètre selon le type de vieillissement (Griffiths, 1992).

D'une façon générale, malgré les différences (**Tableau 7**), il est difficile de faire la part du vieillissement intrinsèque et du vieillissement extrinsèque, dont les effets sont cumulés.

Vieillissement intrinsèque de la peau	Viellissement extrinsèque de la peau
Rides fines (Ridules)	Rides
Texture lisse	Texture rugueuse
Teint clair	Teint gris, cireux
Pigmentation uniforme	Pigmentation hétérogène
Perte progressive de l'élasticité	Perte importante de l'élasticité

Tableau 7 - Caractéristiques du vieillissement intrinsèque et extrinsèque de la peau (Langton, 2010)

Chez l'homme, de Rigal et al ont montré une **diminution de l'épaisseur de peau totale à partir de 70 ans**, aussi bien sur une zone photo-exposée (face dorsale de l'avant-bras) que sur une zone photo-protégée (face ventrale de l'avant-bras) de la peau (**Figure 51**) (de Rigal, 1989).

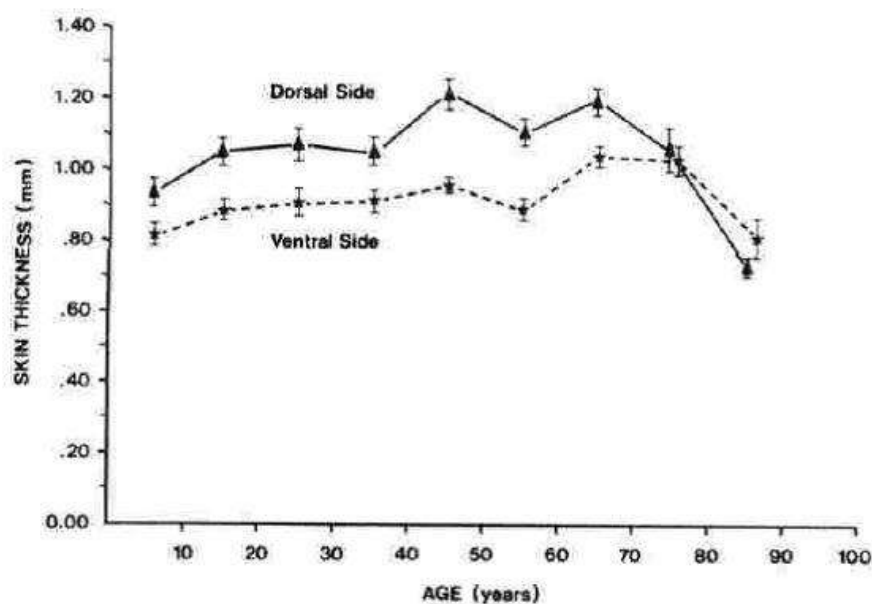


Figure 51 - Variation de l'épaisseur de peau totale Epiderme - Derme (avant-bras) avec l'âge (Echographie 25Mhz) (de Rigal, 1989)

Associée à cette diminution de l'épaisseur de la peau, l'échographie 25 Mhz a révélé une augmentation de **l'hétérogénéité dans le derme**, avec apparition de la **SENEB (Figure 52) (=Sub Epidermal Non Echogenic Band)**. Cette bande non détectable chez le sujet jeune augmente avec l'âge et représente chez le sujet âgé presque toute l'épaisseur du derme.

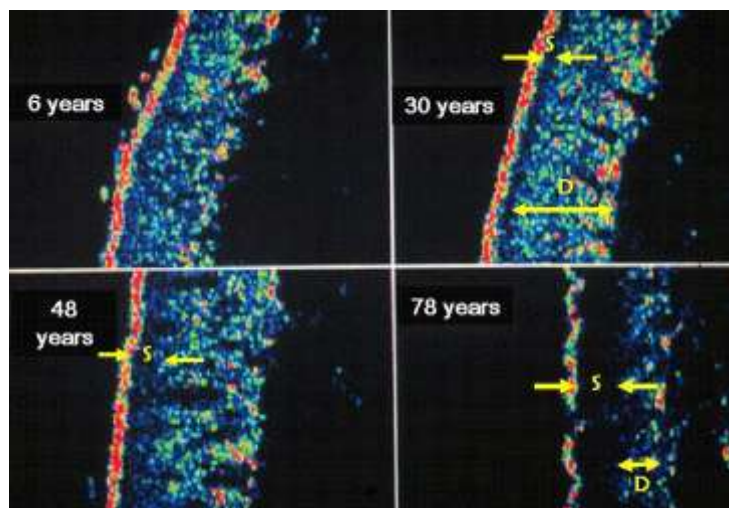


Figure 52 - Sub Epidermal Non Echogenic Band (source : données internes L'Oréal)

L'épaisseur de la peau est relativement fine chez le sujet jeune et les personnes âgées, alors qu'elle est plus épaisse chez l'adulte. Sous la bande rouge, on notera une structure non échogénique que les auteurs ont nommée la SENEb.

D :Dermal Echogenic Band

S :SENEB Sub-Epidermal Non Echogenic Band

Histologiquement, le vieillissement chronologique cutané se manifeste par une atrophie et un amincissement de l'épiderme (Gniadecka et Jemec, 1998), un aplatissement et une duplication de la jonction dermo-épidermique (JDE) (Lavker, 1987) ainsi qu'une réduction et une désorganisation des composants majeurs de la matrice extracellulaire dermique (MEC) : fibres de collagènes, fibres d'élastine, protéoglycanes (PG) et glycosaminoglycanes (GAG) (**Figure 53**). Une peau photo-vieillie, quant à elle, est caractérisée par de l'élastose au niveau du derme et un dépôt de matériel élastique amorphe au niveau du derme papillaire (**Figure 54**). Des analyses immuno-histologiques ont révélé qu'une peau photoexposée était associée au niveau histologique à des signes chroniques d'inflammation, sans manifestation de signes cliniques : augmentation croissante du nombre de mastocytes, de macrophages et de cellules T CD4+ CD45RO+ dans le derme, ainsi qu'une plus grande quantité de cellules dendritiques CD1+ dans l'épiderme (Bosset, 2003).

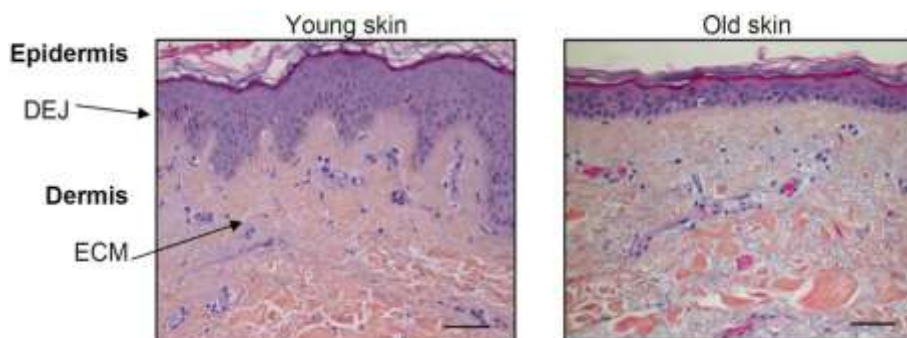


Figure 53 - Sections histologiques (source : données internes L'Oréal)

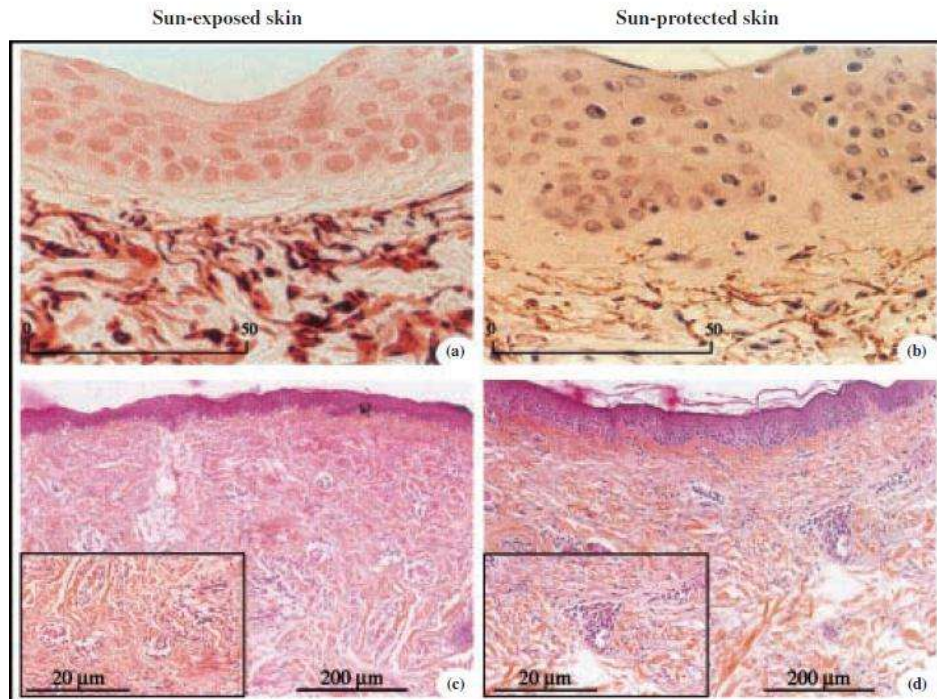


Figure 54 - Caractéristiques histologiques de la peau photovieillie (Bosset, 2003)

Amas de fibres élastiques abondantes réparties depuis la partie haute du derme superficiel partout dans le derme.

Au niveau cellulaire, les voies de communication et les voies de réparation sont modifiées (membranes altérées, médiateurs déficients...) et ne peuvent plus assurer un fonctionnement optimal. Au final, tous les compartiments cellulaires sont concernés par le vieillissement.

Au niveau moléculaire, les mécanismes sont variés, tels que le stress oxydatif, la glycation des protéines, la protéolyse non contrôlée responsable de la dégradation des macromolécules de la matrice, les erreurs commises lors des réparations de l'ADN etc.

Aujourd'hui, il est communément admis que les deux types de vieillissement partagent probablement des mécanismes moléculaires communs, comme c'est le cas dans la formation de ROS et de l'induction de métalloprotéinases (**Figure 55**) (Kohl, 2011).

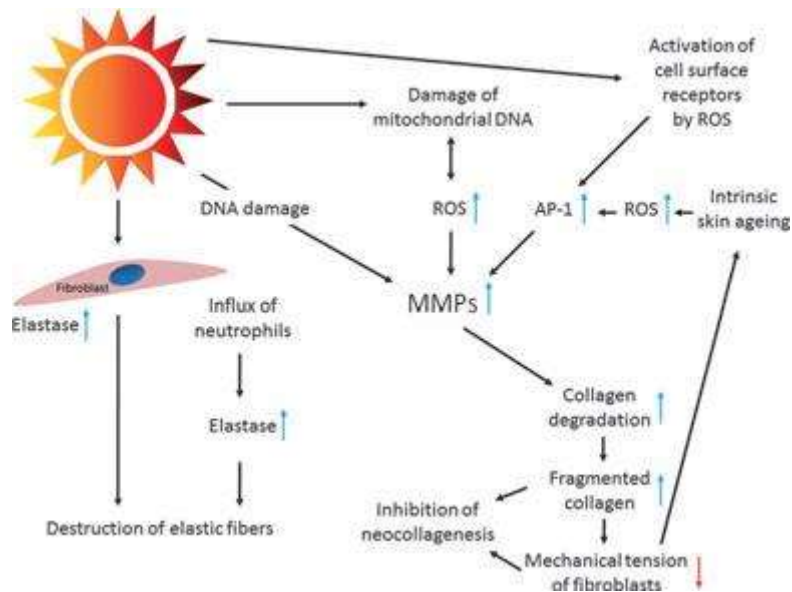


Figure 55 - Représentation schématique des facteurs communs entre vieillissement intrinsèque et extrinsèque (Kohl, 2011)

Comme nous l'avons vu précédemment, la théorie radicalaire du vieillissement s'appuie sur des données montrant une production accrue d'espèces radicalaires et des marqueurs du stress oxydant au cours du vieillissement (Niki, 2009). Viennent s'ajouter les UVA (320-400nm), les UVB (280-320nm) et les infra-rouge proches, IRA (760-1400nm) qui génèrent la formation d'un stress oxydatif sévère dans les cellules des différents compartiments de la peau via l'interaction de chromophores, comme l'acide trans-urocanique identifié dans l'épiderme, absorbant les UVA (Hanson et Simon, 1998) et des molécules photosensibles (**Figure 56**). Ces espèces chimiques ont une grande réactivité et peuvent provoquer d'importants désordres moléculaires : peroxydation lipidique qui atteint les membranes, altérations protéiques et modifications nucléiques, activation de signaux de transduction associés à la croissance, à la différenciation, sénescence répliquative et dégradation des tissus conjonctifs (Pamplona, 2008).

Les enzymes anti-oxydantes de la peau comprennent les superoxydes dismutases (SOD), telles que CuZnSOD, manganèse SOD et catalase. La SOD convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, alors que la catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau. Des données récentes chez l'homme montrent que le déséquilibre de la balance pro/anti-oxydant s'accroît avec l'âge, en relation avec une baisse des défenses anti-oxydantes (Wei, 2011).

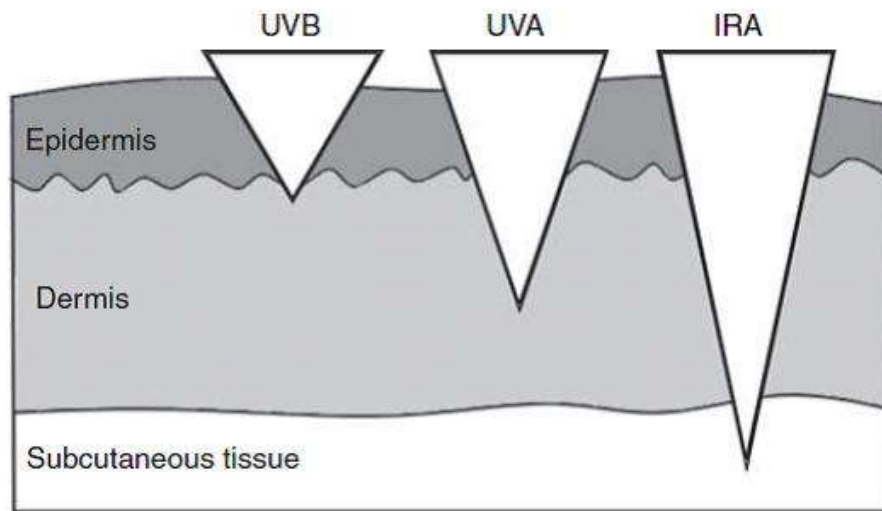


Figure 56 - Pénétration des UVB, UVA et IRA (infra-rouges proches) dans la peau humaine (Schroeder, 2008)

Les mécanismes précis selon lesquels les UVB, UVA et IRA sont impliqués dans le vieillissement prématuré ne sont pas très clairs. Bien qu'un certain nombre de voies moléculaires aient été identifiées, le lien entre les différents mécanismes et les cibles moléculaires reste à élucider. Parmi les voies identifiées, on notera celle de **l'activation de la voie de signalisation MAPK** (mitogen-activated protein kinases), p38 et JNK (c-Jun amino terminal kinase). Cette voie d'activation induit la transcription du complexe de transcription nucléaire AP-1 (activator protein-1), composé des protéines c-Jun et c-fos. Au final, AP1 induit la dégradation de collagène en stimulant l'expression des métalloprotéinases MMP-1, MMP-3 et MMP-9 et en empêchant la synthèse de procollagène-1 (**Figure 57**) (Yaar et Gilchrest 2007). **Les UV peuvent aussi induire la sénescence** cellulaire prématurée sans impliquer le raccourcissement des télomères. Au cours de ce processus, de récentes données suggèrent le rôle-clé de la voie MAP kinase 38 (Debacq-Chainiaux, 2010) en plus de l'implication de la cascade de transduction Ras/Raf/ERK déjà connue.

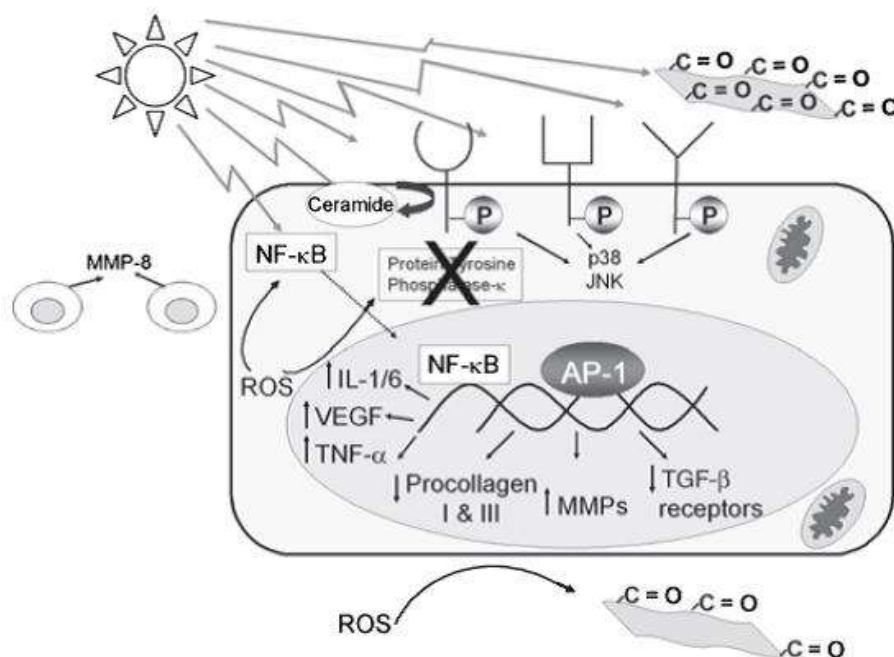


Figure 57 - Mécanismes moléculaires impliqués dans le photovieillissement (Yaar et Gilchrist 2007)

Par ailleurs, l'interaction entre les radicaux libres oxygénés peut former des résidus protéines-carbonyles qui sont détectés en quantité plus élevée dans les différentes couches de la peau chez l'homme (Sander, 2002 ; Kobayashi, 2008).

Le photovieillissement est aussi caractérisé par une augmentation du nombre de délétions dans le génome mitochondrial. La délétion commune est 10 fois plus fréquente dans les peaux photo-exposées en comparaison avec les peaux photo-protégées (Berneburg, 1997) chez un même sujet. De plus, les mutations de l'ADNmt de type « délétion commune » paraissent plus particulièrement spécifiques dans le photovieillissement, car leur quantité n'est pas corrélée au vieillissement chronologique (Koch, 2001).

Nous nous proposons maintenant d'étudier plus en détail les modifications structurales, fonctionnelles et morphologiques de la peau au cours du vieillissement, de la surface vers la profondeur de la peau (**Figure 58**), et ce en portant essentiellement notre attention sur les données cliniques chez l'homme représentatives du tissu *in situ*. Dès que cela sera possible, nous attribuerons ces modifications plus spécifiquement à l'une ou l'autre forme du vieillissement, intrinsèque ou extrinsèque. Enfin, pour terminer ce chapitre, nous nous intéresserons au vieillissement du cheveu et du scalp.

1.3.2 Focus sur le vieillissement des différents compartiments de la peau

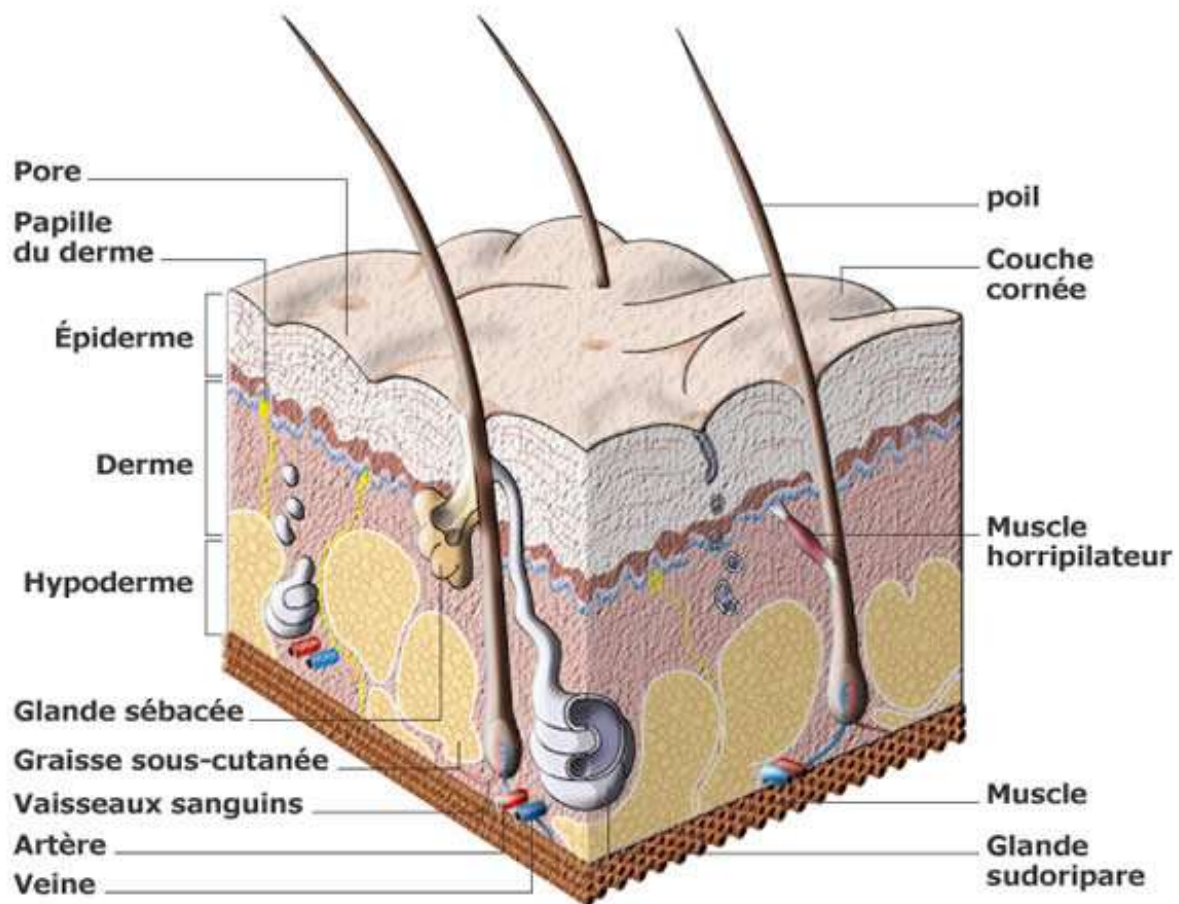


Figure 58 - Coupe de peau. (CNRS, Laboratoires de tribologie et dynamique des systèmes)

1.3.2.1 L'épiderme

L'épiderme est un tissu qui nécessite des mécanismes précisément contrôlés pour assurer le maintien de la fonction barrière indispensable à l'intégrité des tissus. Son renouvellement permet l'élimination des cellules endommagées au niveau du stratum corneum. Son turnover constant est réalisé à partir de cellules de la couche basale comprenant des cellules souches épidermiques qui présentent un haut potentiel prolifératif, une grande capacité à s'autorenouveler et à générer des cellules filles ou des cellules à amplification transitoire (TAC = Transit Amplifying Cells). Après quelques cycles de division, les cellules à amplification transitoire entament un processus de différenciation terminale, dénommé kératinisation ou cornification. Les cellules à amplification transitoire quittent alors de façon permanente le cycle cellulaire pour se différencier progressivement en cornéocytes au cours de leur migration vers l'extérieur. Par ailleurs, les mélanocytes, eux aussi distribués dans la membrane basale, pourraient jouer un rôle protecteur des cellules souches et des cellules basales prolifératrices (Kronic, 2009) (Figure 59 et Figure 60).

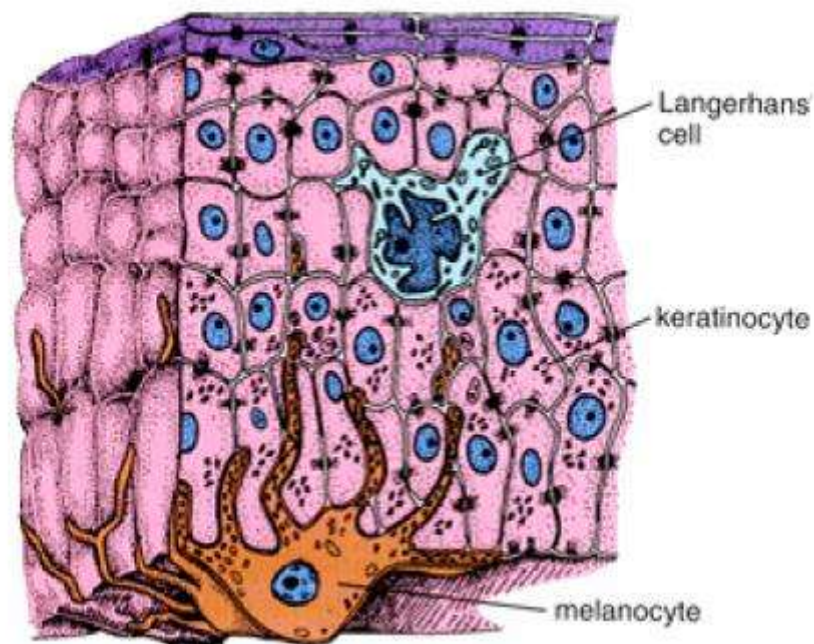


Figure 59 - Les différentes cellules de l'épiderme

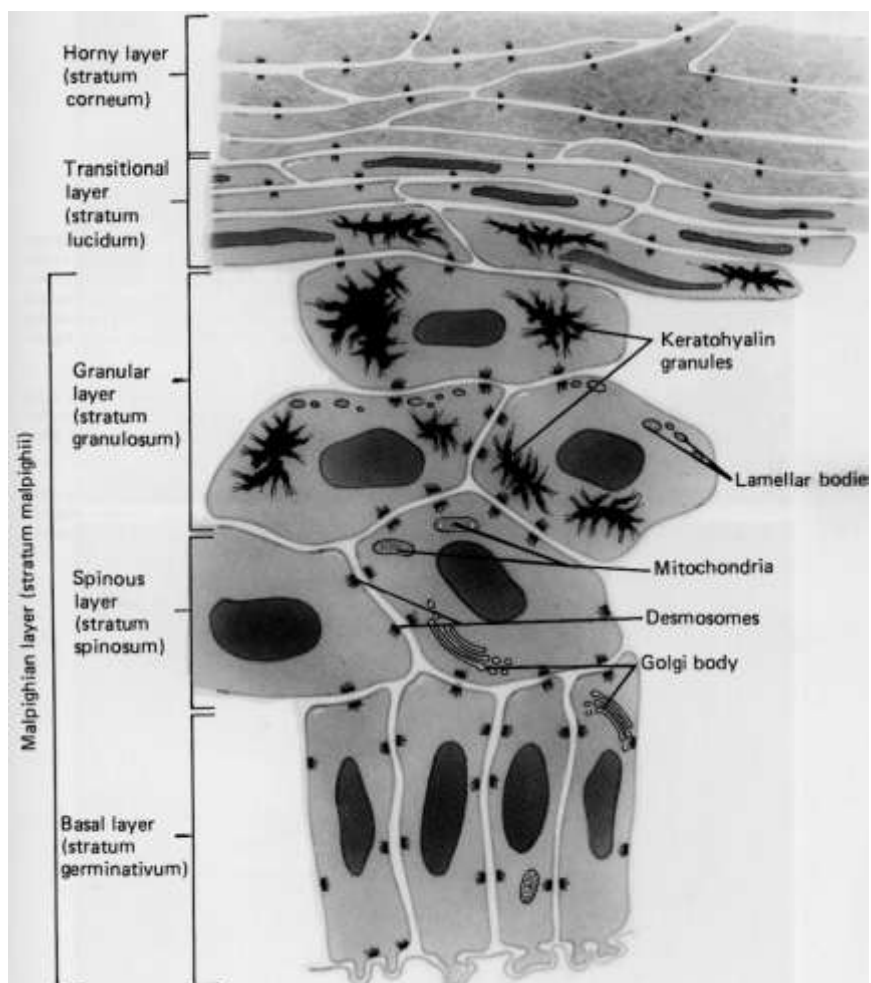


Figure 60 - Représentation schématique des différentes couches de l'épiderme (Montagna, 1992)

Certaines études ont mis en évidence un amincissement de l'épiderme avec l'âge au cours du vieillissement chronologique (Lavker, 1979), et une modification de la composition du stratum corneum (SC) (Elias et Gadjally, 2002 ; Hashizume, 2004). En particulier, le renouvellement des lipides semble réduit (Jensen, 2005).

Remarque : Il existe de nombreuses données contradictoires, aussi bien sur la variation de l'épaisseur de l'épiderme (Whitton et Everall, 1973) que sur la composition et le renouvellement des lipides au cours du vieillissement (Waller et Maibach, 2006).

Par ailleurs, **le processus de cicatrisation est ralenti**, en relation avec une diminution de la capacité proliférative des kératinocytes (Yaar, 2002). De plus, la fonction barrière est plus facilement altérée chez les sujets âgés comparativement aux sujets jeunes, avec un temps de récupération doublé chez les sujets âgés, ce qui serait en partie dû à une diminution de la synthèse lipidiques (Elias et Gadjally, 2002 ; Marionnet, 2003). L'ensemble de ces observations cliniques indique que le potentiel régénératif et la fonction globale de l'épiderme sont altérés avec l'âge. Dans la mesure où les capacités régénératives de la peau sont dépendantes de la fonctionnalité des cellules souches et des cellules pro-génitrices, plusieurs travaux se sont intéressés aux modifications de ces cellules au cours du vieillissement dans les populations de kératinocytes. Ainsi, des travaux récents, menés à partir des prélèvements de peau collectés sur 50 volontaires âgés de 18 à 71 ans, ont montré que le nombre de cellules souches épithéliales ne diminuait pas au cours du vieillissement. En revanche, il semblerait que des modifications de leur microenvironnement auraient un impact sur la capacité de régénération de la peau, et donc sur leur fonctionnalité (Zobiri, 2012). Ces travaux viennent corroborer des études chez la souris. Les résultats suggèrent que les cellules souches de l'épiderme seraient intrinsèquement résistantes au vieillissement ; ce serait leur environnement local ou les facteurs systémiques qui moduleraient le vieillissement (Giangreco, 2008). Ainsi, l'analyse de la transcription des gènes (par la technique DNA microarray) à partir de cellules souches épithéliales de follicules pileux a mis en évidence une augmentation de l'expression de plusieurs types de cytokines responsables de l'altération de leur fonctionnalité (Doles, 2012). L'inflammation à long terme étant liée à la progression tumorale, les auteurs suggèrent que l'altération des cellules souches et, en conséquence, l'altération des tissus pourraient être le résultat de mécanismes suppresseurs de tumeurs.

Remarque: D'autres travaux sur des cellules souches épidermiques de souris n'ont pas mis en évidence de différence, ni dans leur nombre, ni dans leur fonctionnalité, ni de différence dans l'expression de gènes, ni une augmentation des ROS avec l'âge. Les auteurs considèrent les cellules souches épidermiques comme un modèle unique parmi les cellules somatiques dans la mesure où elles semblent résister au vieillissement (Racila et Bickenbach, 2009).

De plus, **les hormones féminines pourraient aussi influencer significativement la composition du SC en sphingolipides**, suggérant ainsi qu'une diminution du taux hormonal au cours du vieillissement pourrait aussi impacter la fonction barrière. Enfin, l'expression de molécules spécifiquement impliquées dans l'adhésion basale des kératinocytes (intégrines $\alpha 6\beta 4$, par exemple) (Aumailley et Rousselle, 1999 ; Kaya, 2006) ou dans la cohésion des kératinocytes (CD44), récepteur de l'acide hyaluronique) (Bourguignon, 2004 ; Hudson, 1995) diminue avec l'âge. L'acide hyaluronique (glycosaminoglycane non sulfaté), largement distribué dans la peau, est impliqué dans l'épiderme, dans l'adhésion des cellules et sur

l'épaisseur de l'épiderme, la régulation de la prolifération, l'adhésion, la migration, la différenciation, la réponse inflammatoire et la cicatrisation via ses récepteurs CD44 et RHAMM (Hyaluronan-mediated motility receptor). Il diminue de façon drastique avec l'âge (Oh, 2011) tout comme le syndécan 1, un protéoglycane transmembranaire, composé d'une protéine cœur portant plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes et exprimé dans toutes les strates de l'épiderme et localisé aux jonctions cellule/cellule (**Figure 61**).

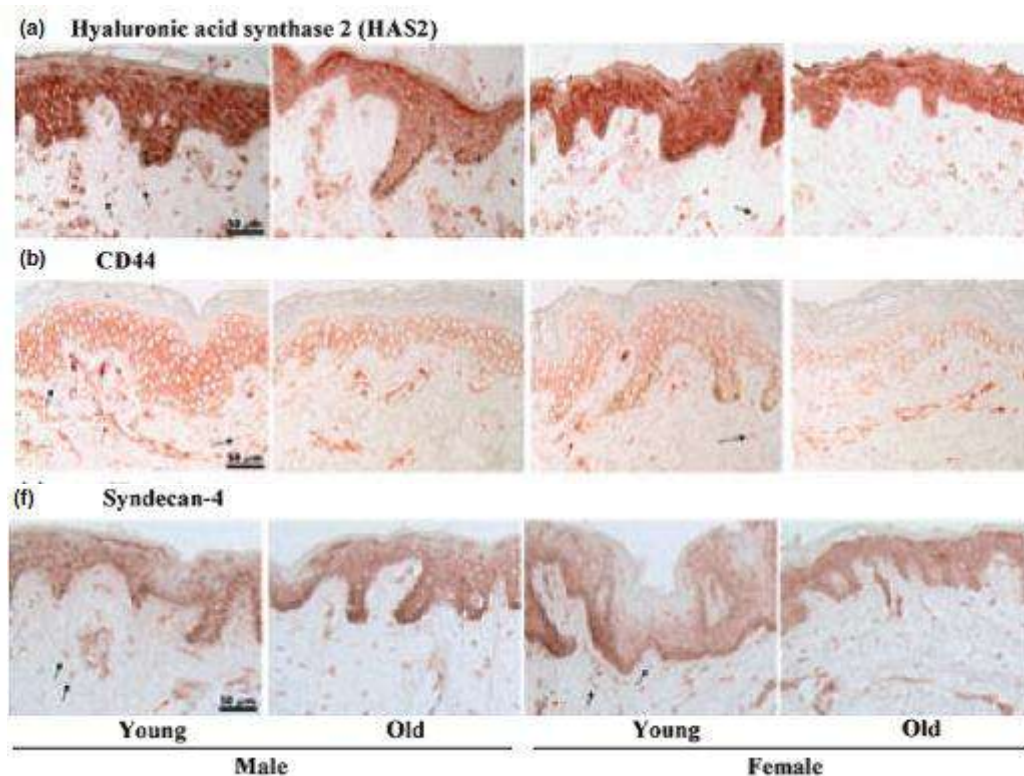


Figure 61 - Changements en HAS2, CD44 et Syndecan 1 au cours du vieillissement (Oh, 2011)

Changements en HAS2 (Hyaluronic acid synthase 2), CD44 et Syndecan 1 au cours du vieillissement chronologique chez l'homme et la femme - biopsies de la peau de fesse.

Quant au **photovieillissement**, il se caractérise histologiquement par une **variabilité de l'épaisseur de l'épiderme avec une maturation désorganisée** de ce dernier (Yaar, 2002). Les mélanocytes sont distribués de façon hétérogène au niveau de la membrane basale, avec, soit une augmentation, soit une diminution de mélanocytes en fonction des zones. Le nombre de cellules de Langerhans est lui aussi diminué, ce qui entraîne une baisse de la réponse immunitaire (Gilchrest, 1982). Aujourd'hui, le postulat proposé est celui-ci : d'une part, l'atrophie épidermique, le ralentissement du processus de cicatrisation et les pseudo-cicatrices dépigmentées seraient la résultante de l'apoptose des cellules souches dans la couche basale de la peau et dans le bulge du cheveu induite par les UV ; d'autre part, la plus grande production de mélanine observée dans les mélanocytes sénescents (Bandyopadhyay et Medrano, 2000) pourrait être responsable du « bronzage » permanent observé sur la peau de certains sujets photovieillis.

Remarque : Les événements moléculaires qui conduisent aux modifications pigmentaires caractéristiques de la peau photovieillie restent à élucider.

Ce sont les **UVB** qui agissent préférentiellement dans l'épiderme en provoquant des dommages de l'ADN, aussi bien dans les kératinocytes que dans les mélanocytes. Ils induisent aussi la production de facteurs solubles et plus particulièrement des enzymes protéolytiques. Par la suite, ces enzymes affectent le derme (Fisher, 1997). Quant aux radiations UVA et IRA, elles pénètrent plus profondément dans la peau avec des effets directs dans le derme et l'épiderme (**Figure 56**).

Les ROS induits par les UV endommagent les protéines parmi d'autres composants cellulaires. Dans les kératinocytes, on observe un déclin de l'activité du protéasome, plus précisément de certaines de ses sous-unités, associé à une accumulation de protéines oxydées (Farout et Friguet, 2006), aussi bien au cours du vieillissement chronologique que de la sénescence répllicative et du photovieillissement (Petropoulos, 2000). Récemment, Bulteau et al ont montré *in vitro* que la partie centrale du protéasome 20S était plutôt résistante aux UV (Bulteau, 2007). Au niveau de la structure générale des protéines, alors que dans les peaux jeunes photoexposées ou photoprotégées la majorité des protéines ont une conformation hélicoïdale, des changements de conformation sont observés dans les peaux âgées, et de façon plus marquée dans les peaux photoexposées. Grâce à la spectroscopie Raman, Gniadecka et al ont montré une augmentation du repliement avec une exposition moindre des résidus aliphatiques vis-à-vis de l'eau (Gniadecka, 1998). De plus, l'augmentation d'acides aminés hydrophobes dans le stratum corneum, telle que rapportée chez les sujets âgés, pourrait expliquer l'augmentation de la xérose chez ces individus, tant on sait que les acides aminés jouent un rôle important dans la liaison avec l'eau dans le stratum corneum (Waller et Maibach, 2006).

Pour conclure, on peut se demander si l'épiderme constitue une cible majeure du vieillissement. En effet, cette strate qui protège l'ensemble du corps se renouvelle presque à un rythme constant durant la vie d'un individu. En plus des cellules souches épidermiques dont le nombre reste constant avec l'âge, l'épiderme est un des rares tissus-parmi ceux qui se régénèrent-à exprimer la télomérase (Boukamp, 2005). A ce jour, il n'y a aucune preuve du déclin de son activité avec l'âge *in vivo*, ni d'une diminution statistiquement significative de la longueur des télomères au cours du vieillissement (Krunic, 2009). Enfin, des approches récentes d'épigénomique ont révélé une certaine stabilité du méthylome, mais ont également identifié dans l'épiderme âgé des modifications locales du taux de méthylation qui impactent l'expression de gènes, notamment ceux impliqués dans la régulation des structures chromatinienne (Raddatz, 2013).

Qu'en est-il du vieillissement de la zone sous-jacente à l'épiderme, la Jonction Dermo-Epidermique (JDE)?

1.3.2.2 La jonction dermo-épidermique

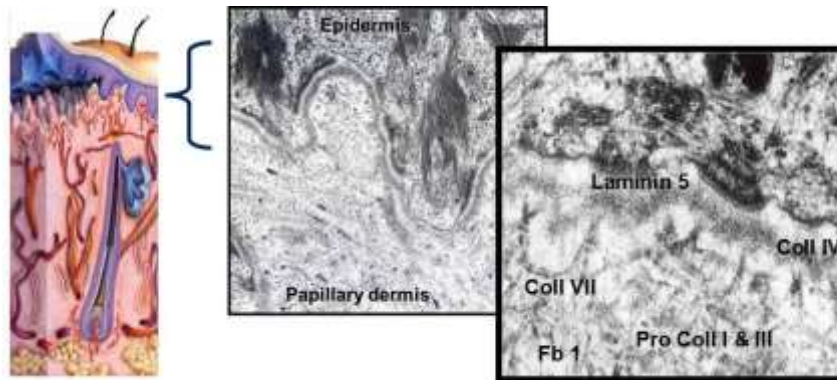


Figure 62 - Vues schématiques et au microscope électronique à transmission de la jonction dermo-épidermique de la peau humaine (source : données internes L'Oréal)

Structure complexe résultant de l'interaction entre les kératinocytes et les fibroblastes, la JDE est importante pour de nombreuses fonctions biologiques. Elle permet, d'une part, la **cohésion entre l'épiderme et le derme** (Marionnet, 2006) et constitue, d'autre part, une **interface dynamique pour la régulation des échanges des facteurs solubles entre l'épiderme et le derme** (Finch, 1989) (**Figure 62**). Ainsi, cette structure particulière contribue au maintien de la fermeté et de la densité, permettant ainsi d'atténuer les signes visibles de l'âge (rides, ptose). Histologiquement, la caractéristique la plus marquante du vieillissement de la JDE est son **aplatissement** avec la **perte progressive de son ondulation**. Au cours du vieillissement, on observe une **diminution de l'expression de collagène VII**, responsable de l'ancrage de la membrane basale aux fibres de collagènes du derme (Chen, 1994) et un **dédoublément (réduplication) de la lamina densa**, zone d'ancrage intermédiaire pour les filaments issus de l'épiderme et ceux issus de la zone fibrillaire du derme papillaire (Lavker, 1987) (**Figure 63 et Figure 64**). Cette perte de collagène VII, plus significative dans les peaux photovieillies, associée à la perte d'interconnexion avec d'autres protéines au niveau de la membrane basale (laminines, perlecan, nidogènes, collagène VI) conduit à la perte d'intégrité de l'architecture de la peau et à la diminution de la résistance de la peau au stress mécanique (Oh, 2011 ; Watson, 2001 ; Lavker, 1979 ; Camacho- Vanegas, 2001 ; Batisse, 2002).

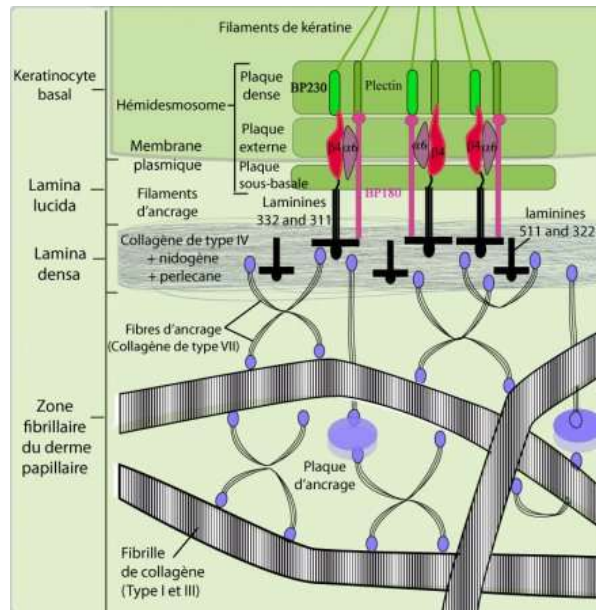


Figure 63 - Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique (source : <http://biologiedelapeau.fr>)

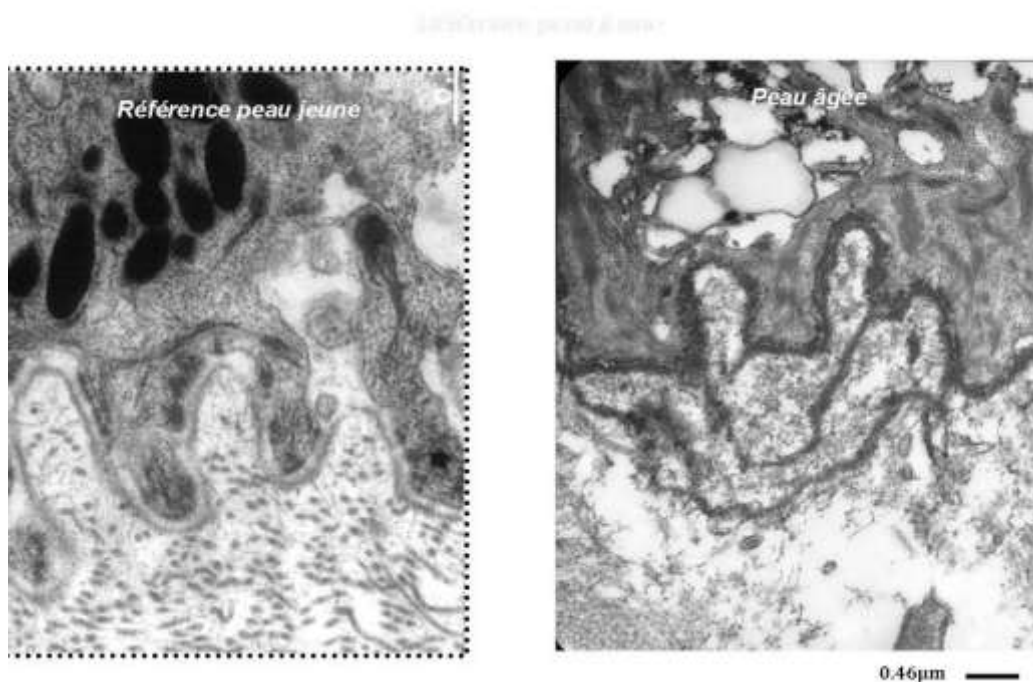


Figure 64 - Vues au microscope électronique de la réduplication de la lamina densa de la peau humaine (source : données internes L'Oréal)

Toutes les altérations au niveau de la JDE ont des répercussions sur les propriétés mécaniques de la peau assurées en grande partie par le compartiment dermique.

1.3.2.3 Le derme

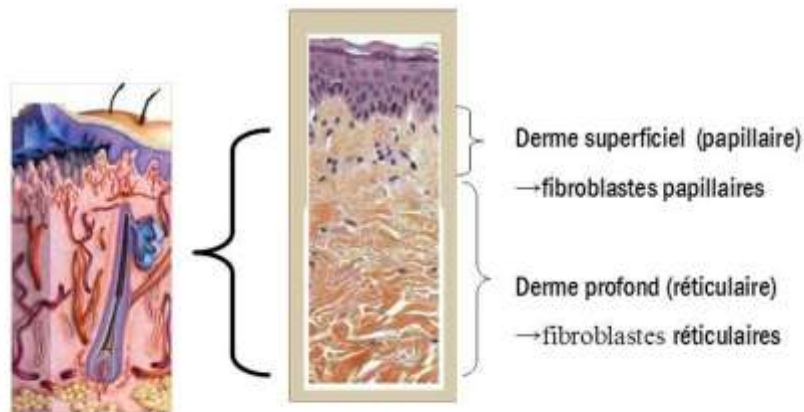


Figure 65 - Vues schématiques et histologiques du compartiment de la peau humaine (source : données internes L'Oréal)

Dans ce compartiment (**Figure 65**), le vieillissement se caractérise par des changements phénotypiques des cellules, mais aussi par des **altérations profondes, structurales et fonctionnelles de la matrice dermique extracellulaire (MEC)**. Dans la MEC, les fibres de collagènes, les fibres élastiques et les protéoglycans sont indispensables pour assurer respectivement les propriétés de tension, de résilience et d'hydratation. L'extrême longévité de ces molécules, comparée à celles des protéines intracellulaires, les expose à l'accumulation de dommages conduisant à l'altération de leurs propriétés mécaniques et à la perte du maintien de l'homéostasie tissulaire (Naylor, 2011). En effet, le vieillissement chronologique du derme se caractérise par **une diminution de la synthèse des protéines les plus abondantes du derme, c'est-à-dire des collagènes de type I et III** (Uitto, 1989). L'ensemble des composés fibreux de la MEC se dégrade, c'est-à-dire le réseau fibreux élastique (**Figure 66 et Figure 67**) (Langton, 2010) et les collagènes de type I, III et IV (El-Domyati, 2002). On observe plus spécifiquement dans la peau photovieillie une perte des fibres de collagène VII (Watson, 2001) ainsi qu'une perte de la fibrilline-1 au niveau de la JDE (Watson, 1999).

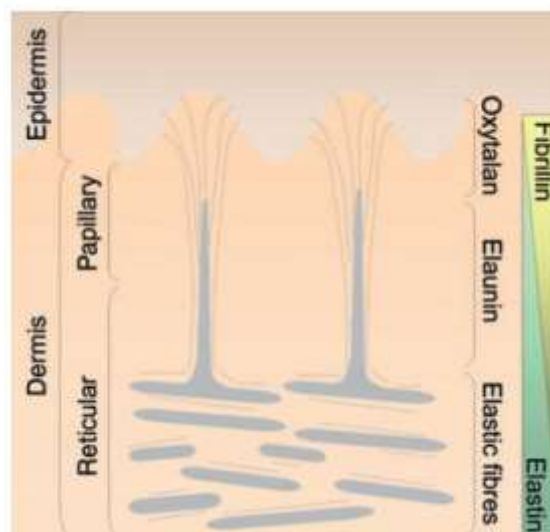


Figure 66 - Le réseau de fibres élastiques : élastine (lignes grises pleines) et fibrilline (lignes grises en pointillés) (Langton, 2010)

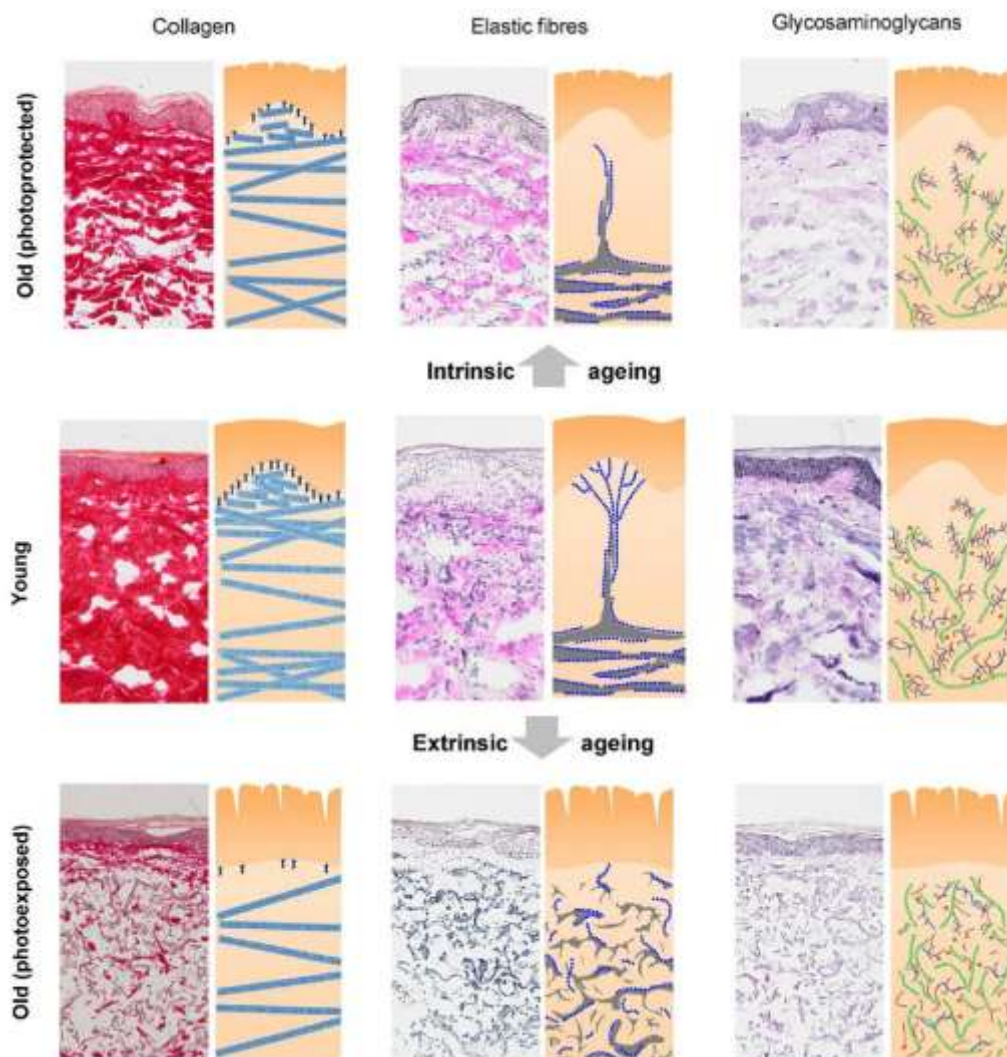


Figure 67 - Remodelage de la matrice dermique extracellulaire au cours du vieillissement intrinsèque et extrinsèque d'une peau âgée (Naylor, 2011)

Toutes ces modifications moléculaires seraient associées à la perte de résilience et à la formation des rides. Il semble très probable qu'il y ait un lien causal entre le remodelage des fibres élastiques et les modifications fonctionnelles de l'élasticité au cours du vieillissement (Sherratt, 2009). En plus des conséquences mécaniques, le remodelage aberrant du système des fibres élastiques semble avoir des effets cellulaires et biochimiques. En particulier, **les fragments d'élastine appelés élastokines auraient une influence sur le système immunitaire** (Adair-Kirk et Senior, 2008) en agissant sur les lymphocytes pour promouvoir l'apoptose (via l'expression des élastases) et sur les monocytes pour contrer le processus inflammatoire (Debret, 2005 ; Baranek, 2007). Les peptides de fibrilline régulent la surexpression des MMPs qui ont la possibilité de dégrader la majeure partie des protéines de la MEC (Naylor, 2011).

Alors que les propriétés mécaniques du derme s'altèrent, associées à la diminution de la solubilité des fibres de collagènes et à la dégradation du réseau de fibres élastiques, **les**

glycosaminoglycans (GAGs) et protéoglycans (PGs), acteurs-clés du dialogue intercellulaire, au caractère extrêmement hydrophile, conférant au derme sa souplesse, sa résistance à la compression, **subissent eux aussi des modifications importantes** (Naylor, 2011) (Figure 67). Ces modifications sont autant quantitatives-synthèse, dégradation, expression de leurs récepteurs membranaires (Tzellos, 2009 ; Oh, 2011) - que qualitatives avec notamment un raccourcissement des chaînes GAG (Carrino, 2011). De façon surprenante, dans la peau âgée photoexposée, comparée à la peau photoprotégée jeune ou âgée, la quantité de GAG augmente, notamment l'acide hyaluronique et la chondroïtine sulfate. A première vue, ces données pourraient paraître paradoxales dans la mesure où la peau exposée âgée présente un aspect clinique parcheminé et plus sec. Or, grâce à la microscopie laser confocale, on a montré que les GAGs dans le derme des peaux âgées photoexposées étaient anormalement distribués sur le matériel élastique (Bernstein, 1996). En d'autres termes, ce réseau est différenciellement remodelé selon la sévérité du photovieillissement. De plus, plusieurs travaux ont montré que l'expression du lumican appartenant aux SLRPs (Small Leucine Rich Proteoglycans), importants dans la régulation et l'organisation du réseau de collagènes, diminuait significativement avec l'âge (Vuillermoz, 2005 ; Oh, 2011). L'équipe de Vuillermoz a montré une diminution de l'accumulation du lumican dans la peau âgée, avec une forte altération du ratio lumican /décorine. Au vu de l'importance de ces 2 SLRPs dans l'organisation et les propriétés du derme, ces auteurs proposent que ces altérations pourraient être impliquées dans les altérations fonctionnelles qui caractérisent la peau âgée (Vuillermoz, 2005) (**Figure 68 et Figure 69**).

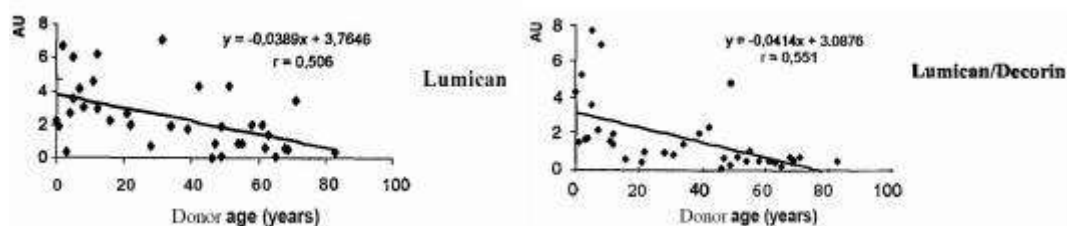


Figure 68 - Diminution de l'expression génique (ARN) du lumican et du ratio lumican/décorine par les fibroblastes de peau humaine en fonction de l'âge du donneur (Vuillermoz, 2005).

AU: arbitrary units

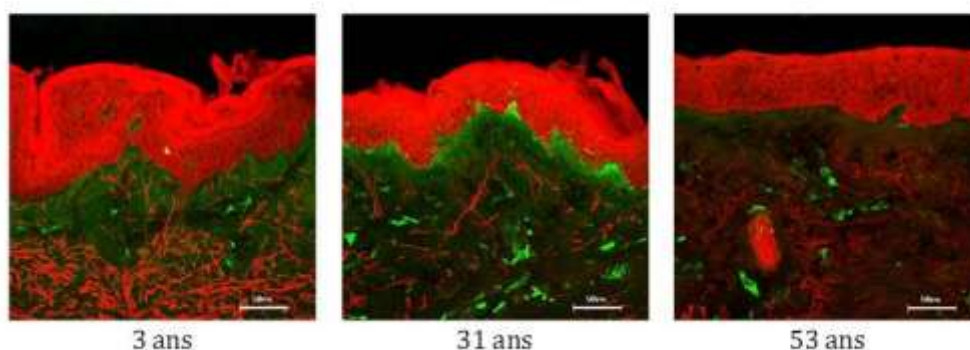


Figure 69 - Diminution de l'expression génique (ARN) du lumican et du ratio lumican/décorine par les fibroblastes de peau humaine en fonction de l'âge du donneur (Vuillermoz, 2005).

Le Lumican est détecté (en vert) dans le derme superficiel par des anticorps spécifiques marqués avec FITC. (IsoThioCyanate de Fluorescéine). Echelle: 50 µm

Par ailleurs, les **produits de glycation appelés AGE** (Advanced Glycation end products), issus d'un processus chimique de glycation qui fixe les sucres sur les fibres de collagènes, **s'accumulent avec l'âge**. Ces fibres s'agglomèrent entre elles, se durcissent et entraînent une rigidification qui contribue aussi à la perte d'élasticité du derme (Corstjens, 2008).

Au final, l'ensemble des altérations moléculaires, telles que la dégradation des fibres de collagène, la diminution de leurs interactions entre elles, leur fragmentation et l'altération des molécules d'adhésion (intégrines et adhésions focales), **pourrait être les facteurs-clés du désancrage des fibroblastes de la MEC** (Nayal, 2004 ; Lavker, 1995 ; Fisher, 2008 ; Zheng, 2012) (**Figure 70 et Figure 71**). Même si les mécanismes moléculaires responsables de l'altération du tissu dermique connectif restent encore à élucider, des études transcriptomiques à partir de biopsies humaines jeunes et âgées ont montré que des taux élevés de CCN1 (Cyr61/CTGF/NOV family member 1), protéines matricielles sécrétées et associées à la MEC, dans la peau humaine âgée, régulaient négativement la synthèse de collagène I et III et augmentaient sa dégradation (Quan, 2010). La même équipe a montré que CCN1 altérait l'homéostasie du tissu collagénique en favorisant l'excrétion de protéines sécrétoires spécifiques, telles que, d'une part, les métalloprotéinases MMP-1, MMP-3 (stromelysin-1) et MMP-9 (gélatinase) et, d'autre part, les cytokines pro-inflammatoires, telles qu'IL-1 β et IL-6 (Quan, 2011). Ainsi, CCN1 serait associé à un phénotype sécrétoire lié à l'âge dans les fibroblastes dermiques capables d'induire la réduction et la fragmentation de collagènes dans la peau humaine âgée (**Figure 72**). D'autres études ont montré que le taux de sécrétion de cytokines (IL-6 et IL-8) était dépendant de l'âge chronologique des fibroblastes humains (Wolf, 2012).

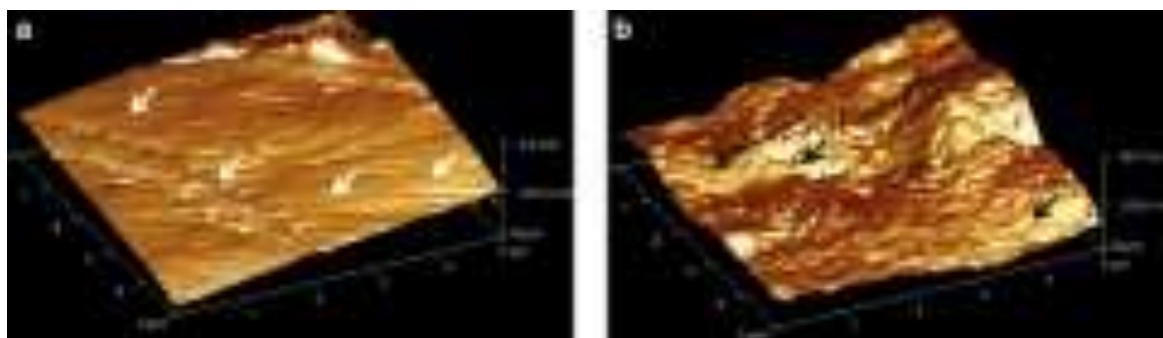


Figure 70 - Les altérations du tissu connectif dermique sont caractéristiques du vieillissement chronologique dans la peau âgée. (Quan, 2011).

Images représentatives par microscopie force atomique (MFA) a) Derme humain jeune : les flèches blanches indiquent les fibrilles de collagènes intactes b) Derme humain âgé : les flèches noires indiquent des fibrilles de collagène endommagées.

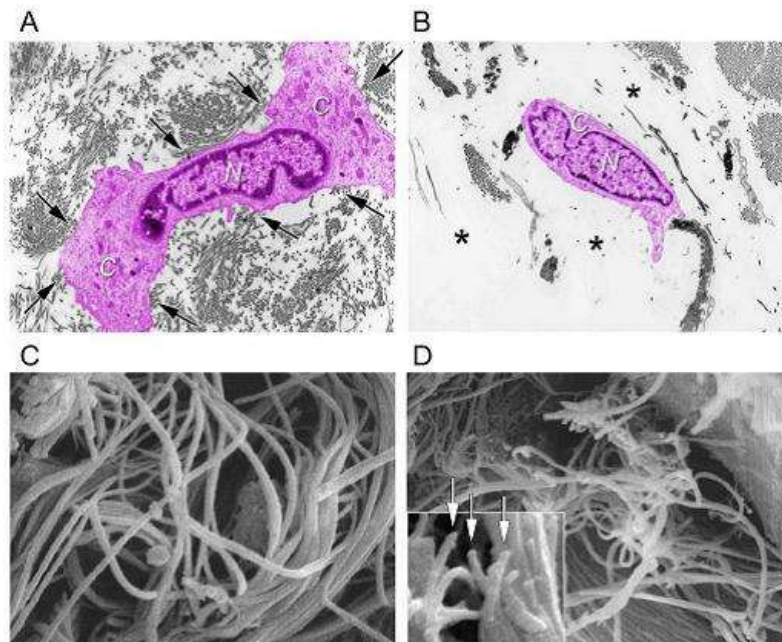


Figure 71 - La fragmentation des fibrilles de collagène dans le derme d'une peau âgée /Photo vieillie est la cause du désancrage des fibroblastes de la MEC (Fisher, 2008).

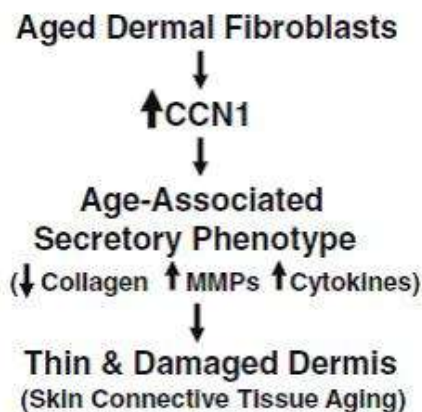


Figure 72 - Proposition de modèle du rôle de l'induction d'un phénotype sécrétoire par CCN1 au cours du vieillissement (Quan, 2011)

Plusieurs équipes suggèrent que **la perte de tension mécanique entre les fibroblastes et la MEC influencent la morphologie et l'activité des fibroblastes papillaires** (Huang, 2012). Ces derniers s'arrondissent et se désancrent de la MEC (Varani, 2004 ; Varani 2006 ; Fisher, 2008), aussi bien au cours du vieillissement intrinsèque qu'extrinsèque, (**Figure 73**). Les modifications morphologiques des fibroblastes associées à la perte fonctionnelle des collagènes de la matrice contribueraient au développement des rides et à la perte des tensions mécaniques de la peau (Fisher, 2008) (**Figure 74**).

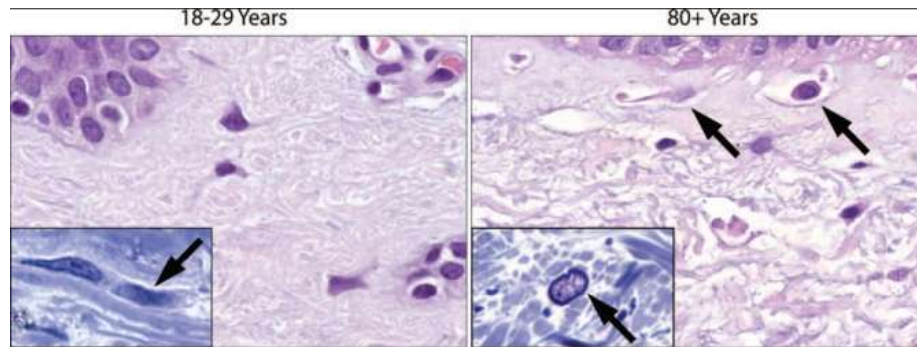


Figure 73 - Coupes histologiques de peau photoprotégée chez le sujet jeune et le sujet âgé (Varini, 2006)

Sujet jeune (18-29 ans): les fibroblastes sont bien étalés et aplatis. Leur surface est en étroit contact avec la MEC.
Sujet âgé (+ de 80 ans): les fibroblastes s'arrondissent et leur surface de contact avec la MEC est réduite.

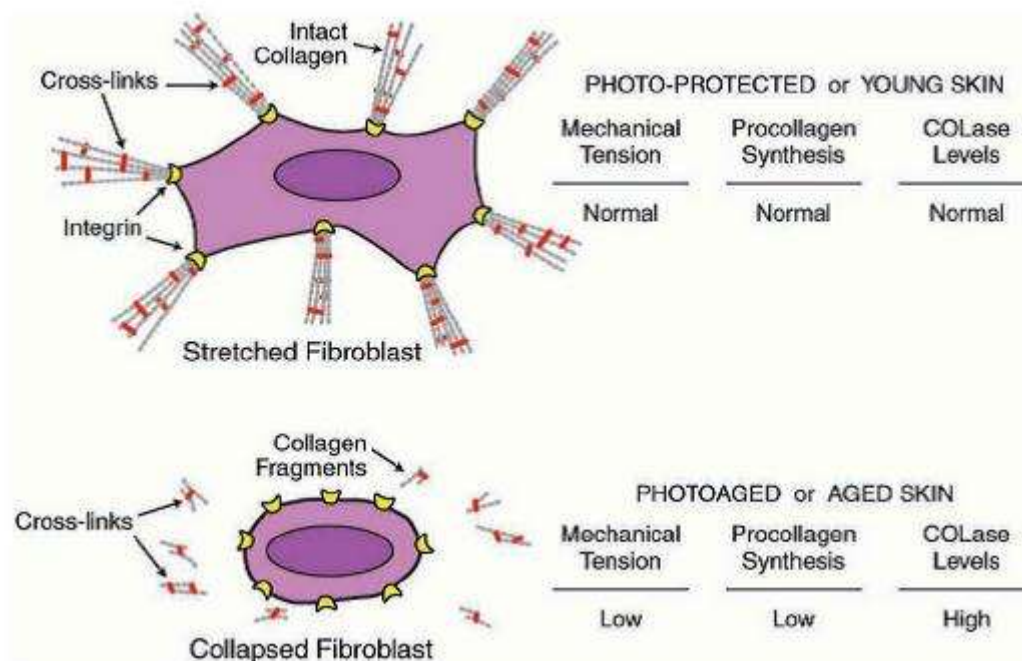


Figure 74 - Lien entre la diminution des tensions mécaniques, la production de collagènes et la fragmentation des collagènes dans la peau humaine (Fisher, 2008)

Récemment, des études *in vitro* sur peau reconstruite et à partir de cultures cellulaires ont identifié le derme superficiel comme une cible préférentielle du vieillissement dans la mesure où les changements cellulaires affectaient préférentiellement les fibroblastes papillaires (FP) (Mine, 2008) (**Figure 75**). Ainsi, au cours du vieillissement, le derme papillaire diminue en volume et les FP ont la capacité de se différencier en fibroblastes réticulaires (Janson, 2013). De plus, la réduction de la capacité de croissance des FP pourrait contribuer à leur déclin dans le derme papillaire. Les modifications de leur profil de sécrétion (augmentation des MMP-1, MMP-2 et MMP-3) pourraient expliquer les modifications structurales du derme superficiel au cours du vieillissement. Ainsi, la perte des caractéristiques des FP pourrait avoir des conséquences à la fois sur le derme et sur l'épiderme.

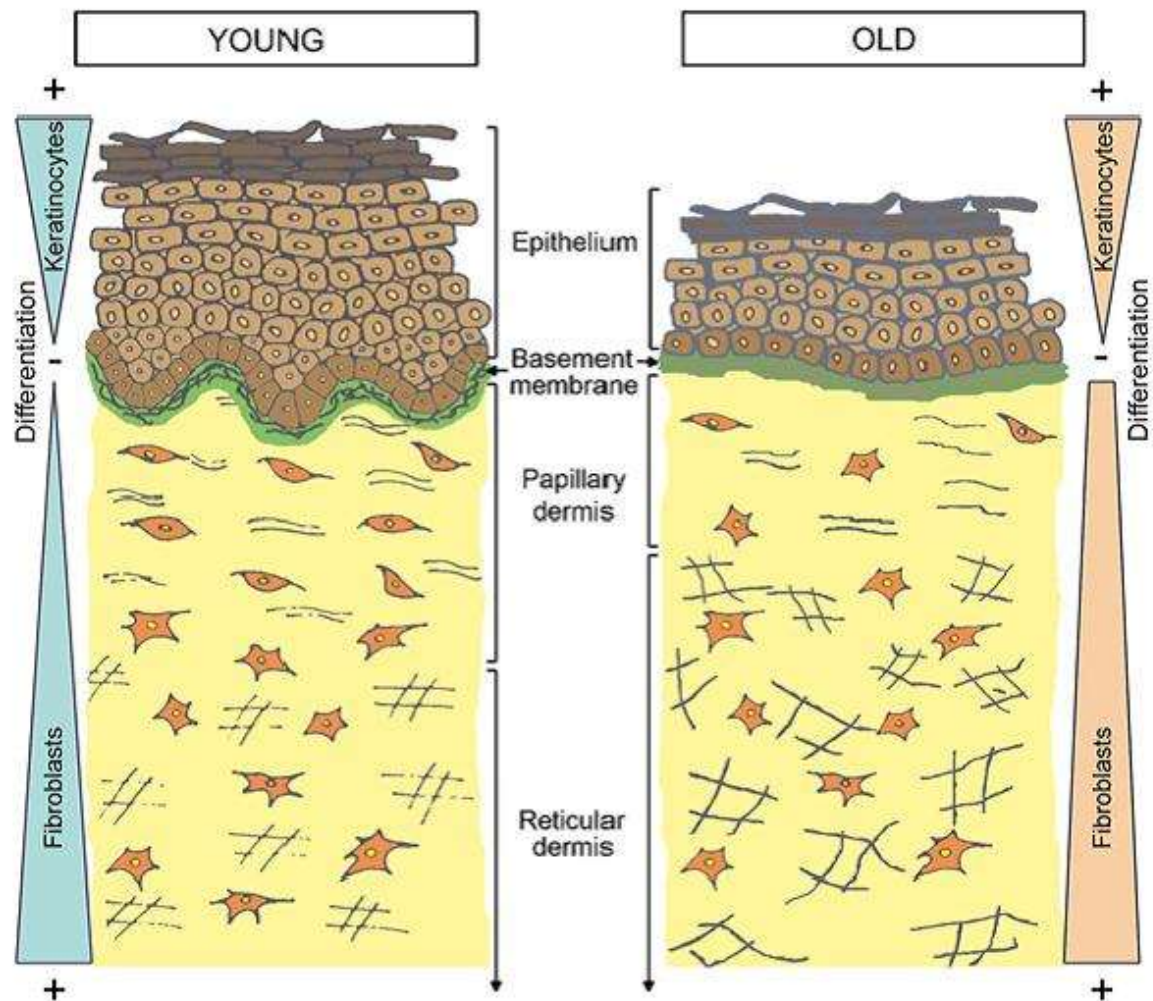


Figure 75 - Illustration de l'effet du vieillissement sur la peau (épiderme+derme) (Mine, 2008)

C'est aussi essentiellement dans cette partie supérieure du derme que l'on retrouve une accumulation des dommages induits par les ROS (Sander, 2002). Contrairement aux cellules épidermiques qui sont dégradées rapidement par les méthionines sulfoxides réductases, les protéines oxydées du derme persistent plus longtemps (Garmyn, 2006). L'accumulation de protéines oxydées dans la cellule inhibe la fonction du protéasome et la capacité des cellules à dégrader des protéines endommagées additionnelles (Chondrogianni, 2003). De plus, on observe une accumulation de lipofuscine, un agrégat hautement oxydé comprenant des protéines et des lipides oxydés qui inhibe la fonctionnalité du protéasome (Terman et Sandberg, 2002). Récemment, des études ont montré que le protéasome faisait partie intégrante de la réponse au stress UV induit en liant la dégradation de protéines intracellulaires et extracellulaires. Ainsi, l'irradiation par les UVA de fibroblastes en culture induit l'augmentation de l'expression du gène codant pour la MMP1 (métalloprotéase matricielle de type 1) impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Catalgol, 2009).

L'ensemble de ces résultats sur le derme a permis d'identifier le derme superficiel comme une cible majeure dans la lutte contre le vieillissement puisque les altérations pourraient avoir des répercussions sur les autres compartiments, JDE et épiderme. En comparaison aux

kératinocytes de l'épiderme, les fibroblastes ne possèdent pas de télomérase (Boukamp, 2005). Leurs télomères sont aussi moins résistants que les kératinocytes aux dommages de l'ADN et à l'inhibition de la croissance par des agents oxydants, tels que les UVB ou les radiations ionisantes. Le raccourcissement des télomères dans les fibroblastes pourrait aussi entraîner des altérations dans l'épiderme (D'Errico, 2007 ; Buckingham et Klingelutz, 2011). Enfin, une autre distinction du derme en comparaison à l'épiderme est la localisation des cellules souches, qui reste à déterminer.

La peau humaine représente un organe de choix pour l'étude des modifications liées à l'âge et des changements épigénétiques, dans la mesure où cet organe est directement exposé aux facteurs environnementaux et qu'il est facilement accessible à partir de prélèvements de sujets sains (biopsies, bulles de succion...). Alors que nous venons de décrire les modifications liées à l'âge dans chaque compartiment de la peau, cet organe doit être considéré avant tout comme une structure tridimensionnelle transversale et continue grâce à l'existence d'un réseau de structures moléculaires sous-jacent à tous les compartiments. C'est l'agencement spécifique des différentes structures moléculaires qui confère des propriétés dynamiques à l'ensemble du tissu et qui garantit l'intégrité de l'architecture de la peau. Au vu de l'interconnexion des phénomènes, des approches globales, telles que la transcriptomique et la protéomique, sont intéressantes car elles permettent de mieux caractériser, sans a priori, les événements moléculaires qui sous-tendent ces altérations. Enfin, alors que l'importance du contrôle épigénétique de l'expression des gènes émerge peu à peu en biologie cutanée, ce seront peut-être les approches d'épigénomique qui permettront d'établir les signatures moléculaires du vieillissement de la peau et d'appréhender les conséquences à long terme des stress environnementaux chroniques sur le tissu cutané. Dans ce sens, une étude à l'échelle du génome portant sur les signatures épigénétiques spécifiques du vieillissement cutané et des effets de l'exposition solaire dans l'épiderme et le derme a révélé des changements significatifs d'un petit nombre de marqueurs, avec deux tendances : i) l'hyperméthylation lors du vieillissement et ii) l'hypométhylation lors de l'exposition solaire. Selon ces chercheurs, **ces modifications épigénétiques pourraient jouer un rôle sur l'apparence de la peau âgée ou exposée chroniquement au soleil** (Gronniger, 2010).

1.3.3 Focus sur le vieillissement du follicule pileux et du scalp

1.3.3.1 Impact de l'âge sur la croissance du cheveu

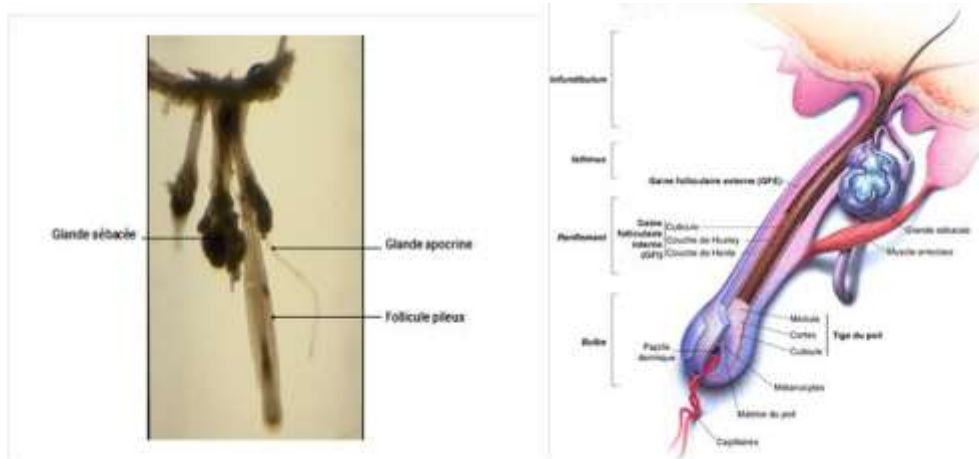


Figure 76 - Follicule pileux in toto (source: L'Oréal)

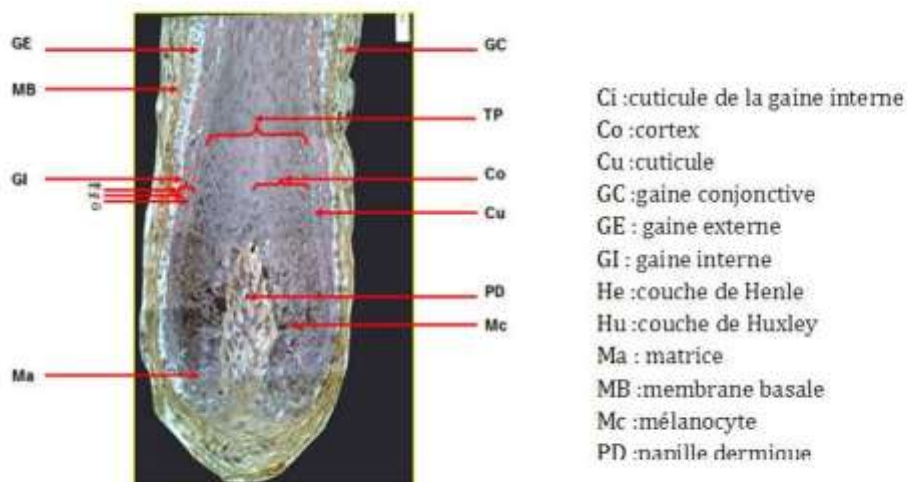


Figure 77 - Les différents compartiments du bulbe pileux (Bernard, 2006)

Les 100000 à 150000 follicules pileux d'une chevelure normale sont soumis continuellement à des cycles de vie. Chaque cycle se caractérise par une phase de croissance de la tige pileuse (phase anagène), une phase d'involution (phase catagène) et une phase de repos, aboutissant à la chute des cheveux (phase télogène) (Courtois, 1994). La durée moyenne de chacune des phases est respectivement de 3 ans, 3 semaines et 3 mois. Au cours de la phase télogène, le cheveu va être éliminé de façon active (phase exogène) avant que le follicule n'entre dans une phase de latence ou phase kénogène (Rebora et Guarrera, 2002) qui peut durer quelques mois. A la suite de la phase télogène, le follicule se régénère à partir d'un

réservoir de cellules pluripotentes au cours d'une phase de néo-morphogénèse active, récemment nommée néogène (Bernard, 2012), puis il entame une nouvelle phase anagène (**Figure 78**). Sur une chevelure normale, environ 85% des follicules sont en phase anagène et 15% en phase télogène. Ces phases successives constituent le cycle pilaire (Bernard, 2006).

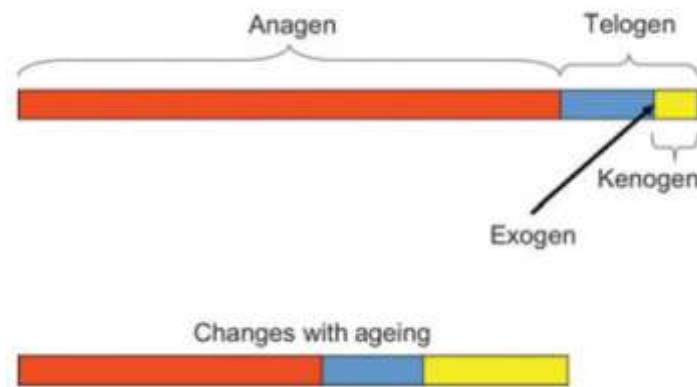


Figure 78 - Représentation des changements du cycle pilaire avec l'âge (Messenger, 2011)

Chaque jour, nous perdons naturellement entre 50 et 100 cheveux. Une fois tombés, les cheveux se renouvellent de façon cyclique, asynchrone et stochastique, à partir d'un double réservoir de cellules souches (Bernard, 2006). Ce renouvellement concerne aussi le compartiment pigmentaire à l'origine de la couleur des cheveux, qui se régénère à partir d'un réservoir de mélanocytes progéniteurs. Au-delà de 100 cheveux perdus chaque jour, on parle de chute excessive ou précoce. Une chute excessive peut être, après 50 ans, le simple signe du vieillissement capillaire naturel, comme l'apparition des rides de la peau. Chez l'homme, on parle d'alopécie androgénétique (AGA), qui est la plus fréquente des alopécies. Elle résulte de l'action accrue des hormones androgènes associée à une prédisposition génétique. Elle est marquée par le retrait de la limite front-cheveux dans la région des tempes, qui se dégarnissent largement. Il apparaît par la suite une perte de cheveux partielle mais croissante dans la région du sommet de la tête (tonsure) (Figure 79).

Remarques : -Chez l'homme, une chute de cheveux excessive peut aussi résulter d'un phénomène de « vieillissement accéléré » du cheveu, se traduisant par une chute précoce pouvant apparaître dès l'adolescence.

-Il existe des variations interethniques de la topographie de la chute masculine, par exemple chez les Coréens, qui sont particulièrement concernés par les chutes précoces au niveau de la nuque (Loussouarn, 2005).

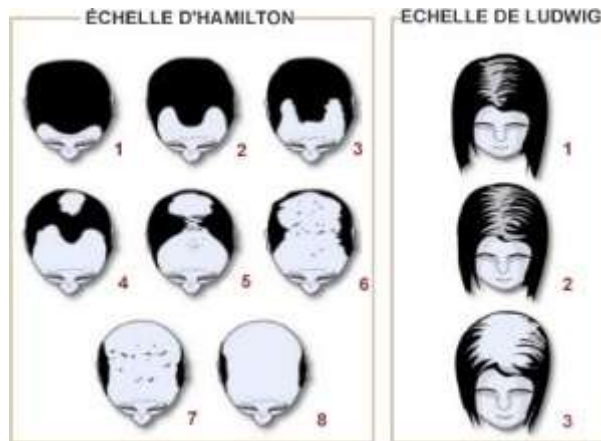


Figure 79 - Echelles globales d'évaluation de l'alopecie chez les hommes (Echelle d'Hamilton) et chez les femmes (Echelle de Ludwig) (Hamilton, 1951; Ludwig, 1977)

L'AGA est caractérisée par plusieurs paramètres parmi lesquels un raccourcissement de la phase de croissance du cheveu (anagène). D'une durée normale de 3-4 ans, elle passe à moins d'1 an. La vitesse de pousse du cheveu est ralentie (Loussouarn, 2005) et la phase de latence s'allonge (période entre la chute du cheveu et l'émergence d'un nouveau cheveu anagène) (Figure 78). Le nombre de cheveux en phase télogène augmente et dépasse 20%. Le follicule s'implante de moins en moins profondément dans le derme et se miniaturise progressivement. Ainsi, le cheveu produit est plus court, plus fin, comparable à un duvet. On parle de calvitie quand le dégarnissement de la chevelure est total. D'autres changements sont aussi observés, tels qu'une fragilité de la fibre capillaire, une diminution de la densité et du diamètre des cheveux (Courtois, 1995 ; Birch, 2001).

Chez la femme, la chute de cheveux est caractérisée par une perte diffuse des cheveux avec une distribution topographique différente de celle de l'homme puisqu'elle affecte le scalp au niveau du crâne et du front (Figure 79). Qualifiée aussi d'AGA, elle est associée à une diminution de la densité des cheveux : la distribution normale de cette variable indique qu'elle est déterminée par un trait multifactoriel. D'autres, tels que le diamètre du cheveu par exemple, peuvent aussi affecter de façon indépendante la densité et la perception de la chute (Birch, 2001). Robbins et al proposent de quantifier la perception de la chute par les femmes en combinant la contribution de la densité avec le diamètre (**Figure 80**) (Robbins, 2012).

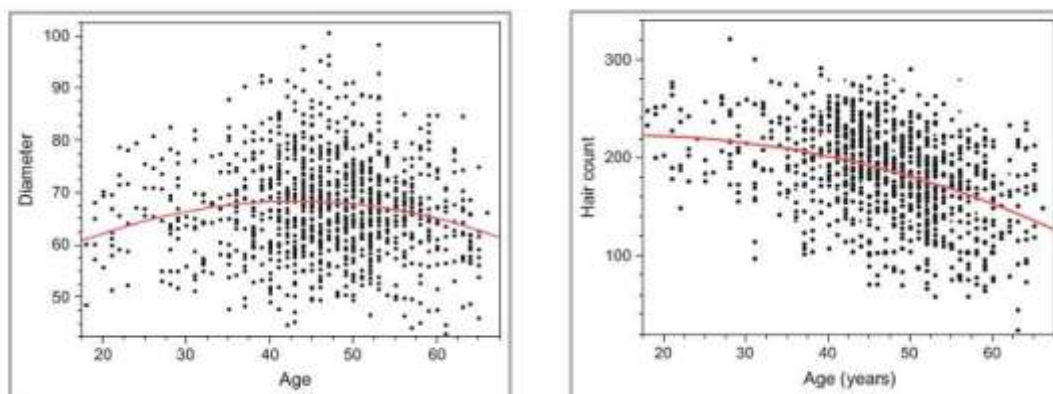


Figure 80 - Diamètre des cheveux en fonction (μm) de l'âge par analyse OFDA (optical fibre diameter analysis) et densité en fonction de l'âge (cheveux/cm²) par analyse d'image (Robbins, 2012)

Le démarrage de la perte des cheveux peut avoir lieu à n'importe quel âge, par exemple à la puberté ou encore aux alentours de la trentaine, période à laquelle il est le plus fréquent. Mais c'est à la ménopause que les femmes perçoivent le plus fréquemment l'étendue de la chute des cheveux qui impliquent des modifications hormonales post-ménopausique dans l'étiologie de la chute (Messenger, 2011). La prévalence augmente avec l'âge : elle approche 40% à l'âge de 70 ans dans la population caucasienne (**Figure 81**).

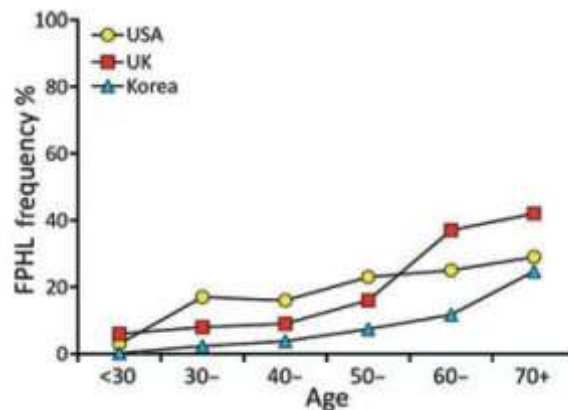


Figure 81 - Fréquence de la population de l'alopecie androgenetique chez la femme (Messenger, 2011)

Enfin, une étude portant sur un grand nombre de femmes coréennes (n= 150) a révélé que le vieillissement intrinsèque du cheveu et du scalp débutait vers la quarantaine avec une diminution des paramètres associés à la croissance - densité, diamètre et force de tension, ce dernier paramètre dépendant du diamètre - ainsi qu'à une diminution de la brillance des cheveux (Kim, 2013) (Figure 82). Dans une étude antérieure portant cette fois sur des femmes japonaises, cette diminution de la brillance a été associée à l'augmentation de la courbure des cheveux.

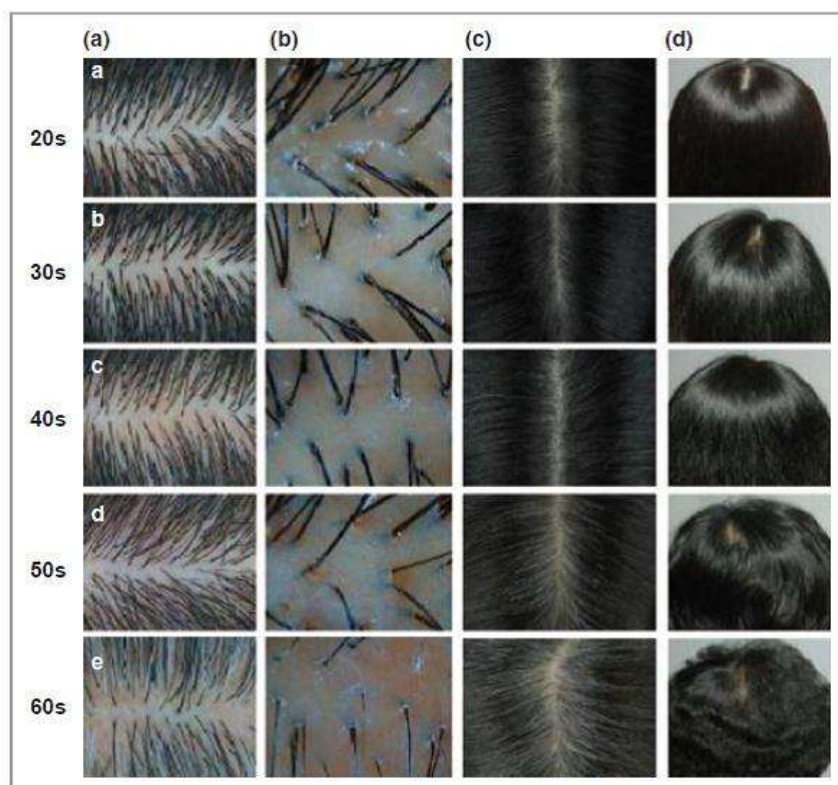


Figure 82 - Photographies représentatives de l'apparence de la chevelure chez la femme coréenne (Kim, 2013)

Vertex - (a) x 10 et (c) x1: densité des cheveux en nombre/cm² ;(b) x60 : diamètre des cheveux en μm .

Couronne au-dessus de la tête - (d) brillance des cheveux (détermination de la valeur du L=luminance)

Remarque : Chez la femme, bien qu'il y ait un déclin progressif de la production de cheveux avec l'âge, on observe une large variation interindividuelle dans la durée de ce processus et la sévérité de la chute.

Histologiquement, chez l'homme, il est communément admis que l'alopecie est un processus caractérisé par la **miniaturisation progressive du follicule pileux** se déroulant sur plusieurs cycles et aboutissant au remplacement des cheveux terminaux par du vellus (Whiting, 1993). Il est communément admis que **ce processus est le même chez la femme**, même s'il n'a pas été étudié aussi en détail. Ainsi, une faible densité des cheveux chez la femme pourrait être due à une prolongation de la phase de latence du cycle pileux aboutissant à des follicules « vides ». Or, Birch et al n'ont pas pu mettre en évidence chez la femme le passage à des diamètres fins associé à une chute de la densité, comme attendu si le processus de miniaturisation est progressif. Selon ces auteurs, ces observations suggèrent que si le processus de miniaturisation existe chez la femme, il pourrait se dérouler rapidement voire, dans l'espace d'un seul cycle pileux (Birch, 2001). Chez la femme, la chute des cheveux est très certainement multifactorielle, impliquant des facteurs environnementaux en plus de sa dépendance aux androgènes et du statut hormonal qui affecte la croissance du cheveu. Enfin, récemment, des travaux ont montré une augmentation de la caspase 1, une protéine impliquée dans la signalisation de l'inflammasome, au niveau de zones alopeciques du scalp. Comme des infiltrats périfolliculaires et interfolliculaires de lymphocytes et de mastocytes, avec possiblement de la fibrose, sont fréquemment observés à partir des biopsies de scalp atteints d'AGA (Jaworsky, 1992), les auteurs suggèrent que la caspase 1 régulerait en amont le

mécanisme de l'inflammation innée régulant ainsi le cycle pileux et l'AGA (de Rivero Vaccari, 2012).

Remarque : -L'influence du statut hormonal sur la chute des cheveux est controversée. En effet, seulement une seule étude épidémiologique parmi les quelques-unes existantes montre une accélération de la prévalence de chute dans les premières années après 50 ans (Messenger, 2011).

-Il reste à démontrer que les facteurs génétiques chez la femme et chez l'homme sont les mêmes.

1.3.3.2 Impact de l'âge sur le blanchissement du cheveu

A côté des modifications observées au niveau de la croissance du cheveu, le **blanchissement des cheveux** est le trait le plus manifeste de son vieillissement. Son incidence et son intensité varient en fonction des différences ethniques et géographiques (Panhard, 2012 ; Kim, 2013). D'une façon générale, 74% des personnes sont concernées par le blanchissement (Panhard, 2012). Malgré tout, il existe une grande variation interindividuelle dans le développement, certainement due à des facteurs génétiques et à des conditions environnementales (stress, pollution, régime nutritionnel...).

Le cheveu blanc est un cheveu non pigmenté. Dépourvu de pigment de mélanine, le cheveu prend un aspect translucide. Le processus de blanchissement est dû à une disparition progressive des mélanocytes souches au niveau du réservoir et, par voie de conséquence de ceux de l'unité de pigmentation chargés de produire la mélanine qui pigmente le cheveu. A chaque cycle, le renouvellement de l'unité de pigmentation faiblit, la quantité de mélanine décroît. Au final, les mélanocytes du réservoir et du bulbe disparaissent totalement, le cheveu devient tout blanc (Commo, 2004).

Enfin, on conçoit aisément que les modifications du cheveu au cours du vieillissement ne vont pas sans la transformation structurale et physiologique de son support biologique, le cuir chevelu. Or, bien que le cuir chevelu soit chargé du maintien physique des follicules pileux, de leur apport en oxygène et en nutriments via la circulation sanguine, le vieillissement du scalp n'a quasiment pas été exploré.

1.3.3.3 Le vieillissement du scalp

Une étude récente sur population caucasienne comparant un groupe jeune (25-35 ans) à un groupe âgé (60-65 ans) a révélé une légère baisse de température du scalp avec l'âge (Poulardier, 2013). Ce résultat inédit est pertinent dans la mesure où la vascularité du scalp diminue avec l'âge (Wright, 2006). D'autres données sur panel de femmes japonaises ont mis en évidence l'existence d'une corrélation entre le flux sanguin et le diamètre du cheveu selon les classes d'âge, soulignant ainsi l'évolution du flux sanguin avec les modifications des paramètres des cheveux (Soga, 2012). De plus, une diminution de la perte insensible en eau a été mesurée dans le scalp des personnes âgées, probablement dû au ralentissement du métabolisme au niveau du scalp plutôt qu'à des modifications dans les composants du stratum corneum (Poulardier, 2013). Par ailleurs, l'épaisseur totale de la peau (épiderme+derme)

aurait tendance à augmenter avec l'âge, alors que celle de l'épiderme diminuerait, cette dernière étant certainement associée à des modifications au niveau de la papille dermique, notamment au niveau de sa hauteur (Poulardier, 2013).

Quant à l'histopathologie du scalp, elle reste très mal documentée, le photovieillissement du scalp n'ayant quasiment jamais été étudié. Récemment, des chercheurs ont étudié les variations immunohistochimiques des structures interfolliculaires du derme réticulaire et de l'épiderme en fonction de l'âge. Parmi les nombreux paramètres analysés, les observations révèlent i) une diminution de la microvascularisation au cours du vieillissement, ii) une réduction des marqueurs du derme (tels que versican) en accord avec la diminution des protéoglycans avec l'âge, iii) des dépôts plus importants de lysosymes au niveau des fibres élastiques caractéristiques des peaux photoexposées, iv) une diminution de l'épaisseur de l'épiderme, conformément aux mesures bioinstrumentales décrites précédemment (Piérard-Franchimont, 2013).

L'ensemble de ces données montre que le vieillissement n'affecte pas seulement la croissance du cheveu et la couleur du cheveu. En effet, malgré ses spécificités, le scalp est fonctionnellement et structurellement affecté en fonction de l'âge.

En résumé,

le vieillissement est un processus multifactoriel et les mécanismes et marqueurs qui interviennent dans ce processus complexe sont souvent interconnectés. Il apparaît donc clairement qu'il est difficile de le cibler entièrement.

Nous venons de voir que les études sur le vieillissement et la longévité sont dominées par des travaux réalisés dans des modèles tels que la levure, le ver, la drosophile et la souris. Dans ces modèles, la plupart des mécanismes sont considérés séparément grâce à une grande variété d'approches (biologie, biologie moléculaire, génétique...). Bien que ces approches expérimentales puissent paraître réductionnistes, l'intérêt de ces modèles «simples» réside dans le fait qu'ils sont souvent bien caractérisés au niveau génétique et que leur environnement peut être bien contrôlé et gardé constant, permettant ainsi de répliquer les résultats dans différents laboratoires.

Toutefois, les travaux de recherche *in vivo* sur l'homme sont cruciaux si l'on considère le vieillissement comme un système intégré. Or, parmi les articles sur le vieillissement qui paraissent dans des revues majeures, peu de données sont disponibles chez l'homme. Ce manque de données constitue un obstacle car certains des résultats obtenus chez l'homme, qui n'émergent pas dans des études réalisées à partir d'autres modèles, sont de première importance pour comprendre, par exemple, la contribution de la génétique sur la longévité. De plus, au vu de l'interconnexion des phénomènes, ces approches devront être complétées par une approche systémique.

Quant à la peau et au cheveu, bien qu'ils représentent les plus vastes organes du corps humain et qu'ils soient facilement accessibles, aussi bien par des techniques invasives que non invasives, peu de connaissances sont à ce jour disponibles. Or, la recherche en cosmétique qui étudie le follicule pileux et la peau constitue un enjeu important pour la prévention du vieillissement et l'adaptation aux sociétés industrielles (pollution, stress...), d'autant que ces domaines sont encore vierges, en particulier dans le domaine du follicule pileux. C'est pour répondre à ce besoin que j'ai mené des travaux sur l'étude du vieillissement du follicule pileux et de la peau, au cœur de la stratégie de la Recherche et Innovation de L'Oréal.

2 TRAVAUX DE RECHERCHE SUR LE VIEILLISSEMENT DE LA TIGE PILAIRE

2.1 CONTEXTE 1

Jusqu'à 50% des femmes et 80% des hommes sont concernés par l'alopecie (Piraccini et Alessandrini, 2014). L'alopecie androgénétique est la plus commune des formes d'alopecie. Le **«vieillissement» capillaire** peut se manifester par une **chute excessive de cheveux** (> 100 cheveux / jour), **une fragilité de la fibre capillaire, une diminution du diamètre et de la densité des cheveux** (cf. 1.3.3.1). L'effluvium télogène chronique peut être associé à l'AGA, ce qui rend le diagnostic plus difficile car les causes de cette chute excessive sont variées (médicaments, malnutrition, carence en fer...).

Parmi les méthodes d'évaluation clinique, les dermatologues disposent d'échelles cliniques globales : celles d'Hamilton et de Savin pour les hommes, et celles de Ludwig et de Sinclair pour les femmes par exemple. Des techniques plus précises, comme le phototrichogramme (Courtois, 1995), une technique de référence non invasive, est utilisée en routine pour évaluer le degré d'alopecie et l'efficacité des traitements. Cette méthode permet d'analyser l'état de la chevelure en termes de cycles de pousse. Le phototrichogramme consiste à raser les cheveux sur une petite surface (environ 1cm²) puis à photographier ou à filmer la zone d'évaluation juste après le rasage et 2 jours après. Ainsi, cette technique permet de calculer la formule pilaire d'un individu à un instant donné en établissant le rapport anagène/télogène. Au-delà de 20% de cheveux en phase télogène, on parle de chute excessive. D'autres techniques, comme le trichogramme par unité de surface, la pesée des cheveux, l'analyse histologique de coupes transverses de biopsies sont aussi pratiquées. Ces techniques de quantification de la densité capillaire permettant d'évaluer l'impact des traitements sont utilisées uniquement dans le cas de test d'expertise, compte tenu de la lourdeur de mise en œuvre de ces méthodes (phototrichogramme, macrophotographie avec rasage et tatouage, mesure du poids des cheveux, unit area trichogramme etc...).

Quelques types de traitements ont actuellement une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de l'« alopecie androgénétique ». Néanmoins, une évaluation simple et objective de l'efficacité de ces traitements reste encore un challenge. De plus, les traitements antiandrogènes ne sont cependant pas toujours efficaces, que ce soit le Minoxidil® chez la femme et chez l'homme, l'Androcur® chez la femme ou encore le finastéride chez l'homme. Le rôle des androgènes et des facteurs héréditaires est important dans l'alopecie androgénétique, mais d'autres facteurs sont impliqués, le tabac par exemple (Trüeb, 2003). Par ailleurs, des traitements sans AMM montrent aussi une certaine efficacité, tels que le traitement antichute Aminexil®, les vitamines per os, la Stemoxydine® (qui joue sur l'environnement optimal des cellules souches), les vitamines injectables et le Céramide R® (ciment intercellulaire) entre les écailles du cheveu.

Cependant, face à une chute de cheveux sévère, dont on a vu qu'elle était multifactorielle, le dermatologue en pratique clinique courante ne dispose que de peu de signes cliniques pour établir le diagnostic et de techniques d'évaluation, soit invasives, soit non invasives -plus facilement acceptées par le patient mais qui peuvent être plus ou moins longues dans la mise en œuvre du diagnostic.

2.2 Question posée

Fort de ce constat, nous nous sommes demandé s'il existait de nouveaux signes cliniques prédictifs de la chute des cheveux pour permettre un diagnostic rapide et non-invasif. L'objectif final étant d'enrichir la sémiologie du scalp et d'aider les dermatologues dans le diagnostic et la prise en charge de l'alopecie dans leur pratique courante.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication d'un article dans la revue Archives of Dermatology (**Annexe 1**):

O. de Lacharrière, C. Deloche, C. Misciali, BM. Piraccini, C. Vincenzi, P. Bastien, I. Tardy, BA. Bernard, A. Tosti et al. (2001) Hair diameter diversity: a clinical sign reflecting the follicle miniaturization. Arch Dermatol 137: 641-646.

2.2.1 Abstract

Background: The degree of androgenetic alopecia is generally evaluated either by global clinical scales or time-consuming methods like phototrichogram or histological studies. We describe a new clinical and reliable scoring method based on hair diameter diversity.

Observations: (1) The clinical macroscopic scoring we propose for hair density was significantly correlated with Hamilton classification and with histological hair density. (2) Diversity in hair diameter was the main and most accurate clinical parameter linked to follicle miniaturization. (C) The anagen-telogen ratio decreased in parallel with the decrease in clinical hair density score.

Conclusions: Considering that hair follicle miniaturization is the key point during androgenic alopecia onset and development, diversity in hair diameter represents an important feature to consider as an accurate clinical sign reflecting hair follicle miniaturization. Moreover, diversity in hair diameter seems to be an easily accessible and reliable parameter that should be taken into consideration for further characterization of hair disorders. By itself, we believe that this clinical feature constitutes a new tool of substantial help for the diagnosis and management of androgenic alopecia.

Arch Dermatol. 2001;137:641-646

2.2.2 Résultats et Conclusion

Nous avons développé une procédure clinique simple et reproductible pour décrire la sémiologie du scalp. A partir d'un grand nombre de volontaires (n=850) participant à un programme national français sur la santé (SU.VI.MAX), nous avons réalisé des évaluations cliniques du cheveu et du scalp grâce à des macrophotographies standardisées. Ensuite, nous avons mis au point des échelles cliniques à partir de ce grand nombre de photographies. La première consiste en une échelle à double entrée combinant les paramètres cliniques densité des cheveux et diamètre des cheveux (**Figure 83**). Les scores macroscopiques de densité de cheveux sont corrélés de façon significative aux scores globaux de la classification d'Hamilton. Les scores élevés de densité (5 et 6) sont représentés par les tout premiers grades de l'alopecie de l'échelle d'Hamilton (I, II) et à la densité évaluée histologiquement (**Figure 84**). Dans la mesure où les biopsies ont été réalisées au même endroit du scalp (zone du vertex la plus communément touchée par l'alopecie), les corrélations significatives entre les scores macroscopiques et les critères histologiques de référence confirment la pertinence de notre outil pour l'évaluation de l'AGA. Néanmoins, alors que l'AGA est aussi caractérisée par une réduction progressive du diamètre des cheveux (cf 1.3.3.1), nos données n'ont révélé qu'une

tendance dans le lien entre les scores macroscopiques de diamètre et la miniaturisation des follicules. Néanmoins, cette absence de significativité de corrélation pourrait s'expliquer par le faible nombre de sujets (n=21) à partir desquels les biopsies ont été effectuées ainsi que par l'absence de vrais contrôles.

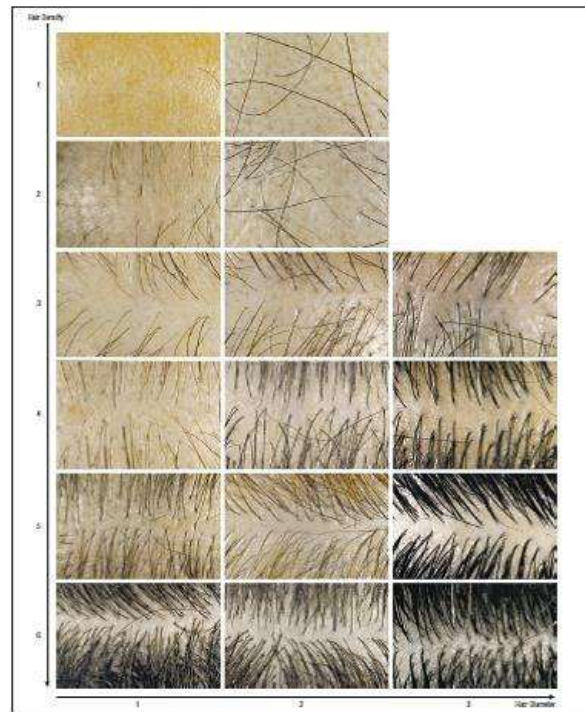


Figure 83 - Scoring clinique de la densité des cheveux et du diamètre des cheveux à l'aide d'une échelle photographique (grossissement original x4).

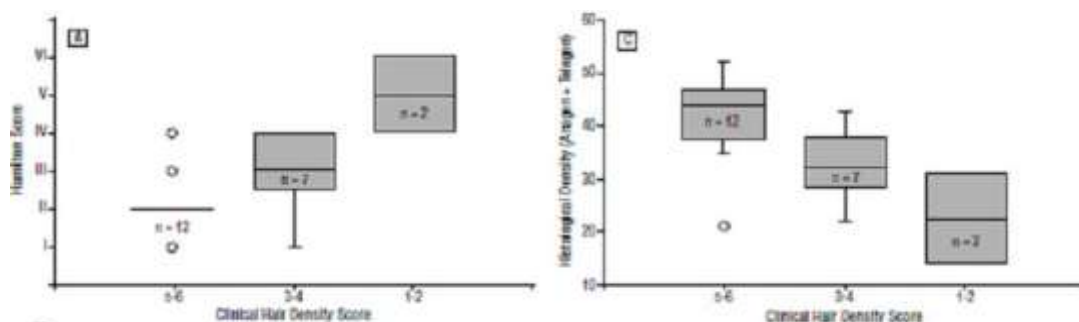


Figure 84 - A) Corrélation significative entre les scores globaux d'Hamilton et les scores macroscopiques de densité ($p=0,01$). C) Corrélation significative entre la densité histologique (cheveux Anagènes+Télogènes) et une augmentation du score de densité ($p=0,006$).

Pour la première fois, nos observations ont révélé **la diversité des diamètres des cheveux** comme un des premiers signes prédictifs du développement de l'alopecie, paramètre lui aussi corrélé aux scores globaux de densité des cheveux et histologiquement à la miniaturisation des follicules, ce dernier étant considéré comme le paramètre-clé du processus de l'AGA (**Figure 85;Figure 86;Figure 87**).



Figure 85 - Echelle de la diversité des diamètres

A gauche, un score de 0 indique moins de 20% de la diversité des diamètres ; à droite, un score de 1 indique plus de 20% dans la diversité des diamètres - (Grossissement original x4).

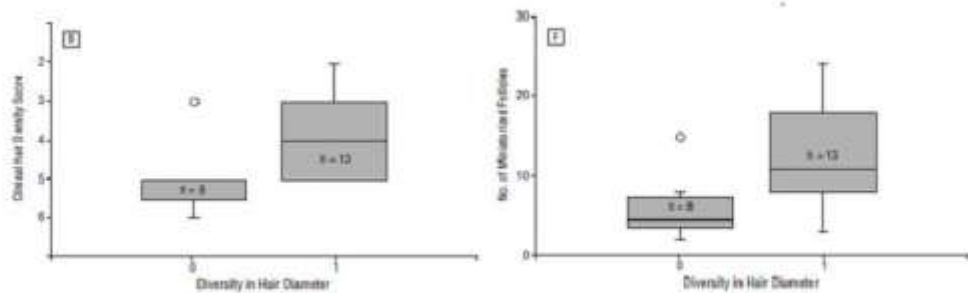


Figure 86 - Analyse statistique des paramètres du cheveu

B) L'augmentation de la diversité des diamètres est associée à une diminution significative de la densité des cheveux ($p=0,02$).

F) Corrélation significative entre la diversité des diamètres et la miniaturisation du follicule ($p=0,02$).

Selon nous, ce paramètre pourrait refléter le processus de miniaturisation du follicule qui n'affecte pas de façon égale tous les follicules pileux d'une même zone. En effet, on trouve sur une même zone la présence simultanée de follicules terminaux, indéterminés et miniaturisés.

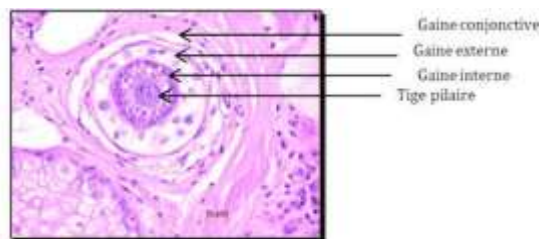


Figure 87 - Follicule miniaturisé - (section horizontale)

Par ailleurs, l'examen des 850 macrophotographies standardisées de la surface du scalp a révélé l'existence de signes péri-pilaires (PPS) jamais décrits auparavant. Caractérisés par des changements à la surface du scalp, à l'émergence de la tige pileaire, deux types de signes sont observés, soit sous la forme d'une turgescence du scalp, soit le plus fréquemment sous la forme de halos brunâtres d'environ 1mm de diamètre au niveau de l'ostium. Ces signes sont le plus souvent observés chez des sujets alopéciques, hommes et femmes, présentant des scores de densité modérée à élevée (**Figure 88 et Figure 89**).



Figure 88 - Echelles de scores des signes périparturaires

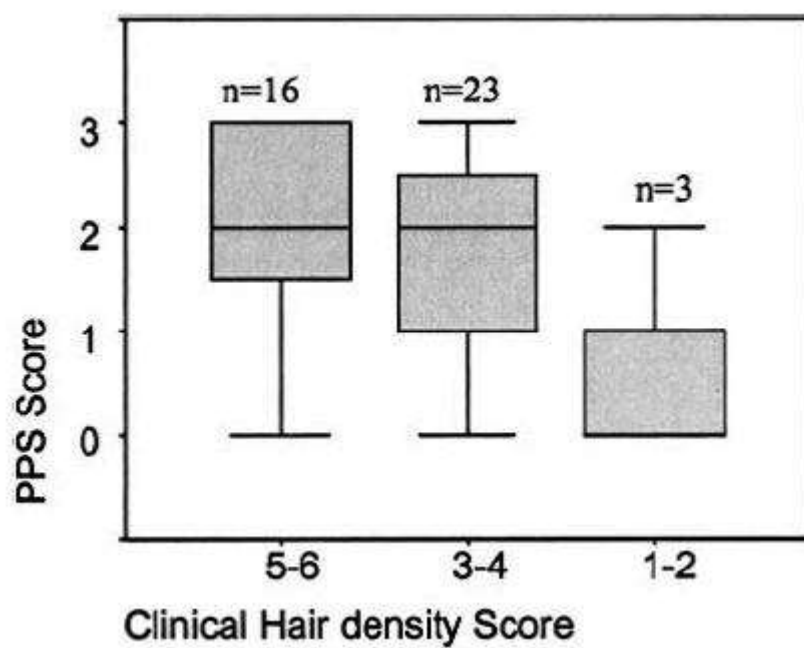


Figure 89 - Lien entre signes périparturaires et de densité des cheveux ($p=0,05$)

2.3 Question posée

A ce stade de la caractérisation clinique, nous nous sommes demandé à quoi correspondaient ces signes au niveau biologique. C'est ainsi que nous avons recherché s'il existait un lien entre ces signes cliniques et des paramètres histologiques.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante (**Annexe 2**):

C. Deloche, O. de Lacharrière, C. Misciali, BM. Piraccini, C. Vincenzi, P. Bastien, I. Tardy, BA. Bernard, A. Tosti (2004) Histological features of peripilar signs associated with androgenetic alopecia. Arch Dermatol Res 295: 422-428.

2.3.1 Abstract

Abstract Background A study of the scalp in a large cohort of volunteers with androgenetic alopecia using macrophotographs showed the presence of peripilar signs (PPS) around the hair ostia.

Objective The aim of the present study was to establish the histopathological features related to PPS.

Design Prospective clinicopathological study.

Setting Department of Dermatology, University Hospital of Bologna.

Patients A group of 40 patients (21 males and 19 females) participated in the study. Macrophotographs of the scalp were taken using a Dermaphot camera and PPS were scored using a three-point scale. Hair density and PPS were clinically scored according to reference scales. Two punch biopsies from the photographed area were obtained from each subject and histological analysis was performed on vertical and horizontal sections.

Observations Clinical parameters indicated that PPS were already detectable on scalp with high hair density. Moreover, in patients with high hair density (score >4), a significant relationship was found between the PPS score and the global score for perifollicular infiltrates. Thus PPS are linked to superficial perifollicular lymphocytic infiltrates in early androgenetic alopecia.

Conclusions PPS could be the clinical signs reflecting the presence of perifollicular infiltrates.

2.3.2 Résultats et Conclusion

Les PPS sont associés à des infiltrats périfolliculaires composés essentiellement de lymphocytes avec quelques mastocytes autour de l'infundibulum, de l'isthmus et de la glande sébacée.

Chez les sujets présentant une densité de cheveu supérieure à un score 4, une augmentation significative du score de PPS est toujours associée à une augmentation du score des infiltrats périfolliculaires (**Figure 90 et Figure 91**). De plus, une augmentation des scores de PPS est associée à une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme du scalp. Cette épaisseur de l'épiderme pourrait être liée à des modifications de l'épiderme en réponse à l'infiltration du derme (**Figure 92**).

En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de lien ni entre les scores de PPS et les scores d'infiltrats inflammatoires, ni entre les scores de PPS et l'épaisseur de l'épiderme pour des scores faibles de densité de cheveux, c'est-à-dire inférieurs à 4.

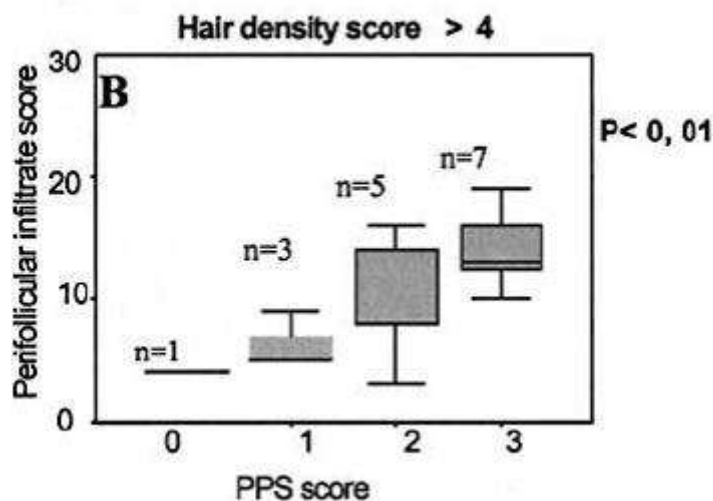


Figure 90 - Corrélation significative entre scores PPS et scores infiltrats périfolliculaires

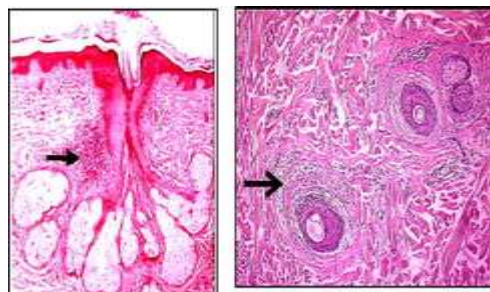


Figure 91 - Pathologie du scalp de l'AGA : infiltrats périfolliculaires.
Section verticale (à gauche) et section horizontale à droite) (HEX60)

Dans notre étude, les PPS sont caractérisés par des halos brunâtres et sont largement observés aussi bien chez des hommes que chez des femmes à des stades précoces de

l'alopecie androgénétique. Néanmoins, la spécificité de ces signes associée à des changements histologiques au cours de l'AAG reste à démontrer.

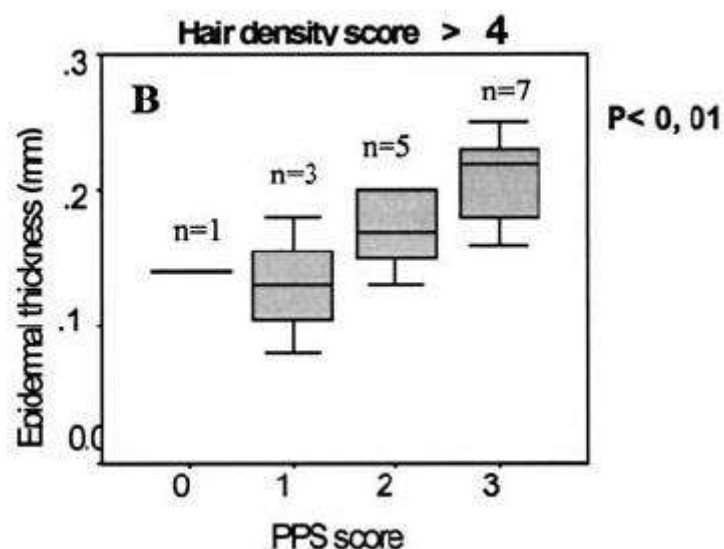


Figure 92 - Corrélation significative entre scores PPS et augmentation épaisseur épiderme du scalp.

Depuis nos travaux publiés en 2001 et 2004, des publications récentes ont confirmé l'intérêt de ces signes (PPS ou halos périfolliculaires) dans l'établissement du diagnostic de l'AGA: i) variabilité du diamètre des cheveux (Piraccini et Alessandrini, 2014) (Figure 93), ii) densité et diamètre des cheveux, en insistant sur la notion de volume qui combine ces 2 paramètres (Robbins, 2012 ; Kim, 2013).



Figure 93 - Vidéomicroscopie de l'AGA (Piraccini et Alessandrini, 2014)
Variabilité du diamètre des cheveux et halos périfolliculaires

Si les signes caractérisant l'AGA chez l'homme sont assez homogènes, il n'en est pas de même chez la femme chez laquelle la chute des cheveux peut être difficile à diagnostiquer de par son caractère multifactoriel.

2.4 CONTEXTE 2

L'effluvium télogène, composante de l'AGA, est un motif de consultation très fréquent des femmes. En effet, l'incidence de ce type de chute atteint 30% chez les femmes aux US, UK et Japon (Rushton, 2002). En consultation, les femmes déclarent avoir une augmentation brutale, diffuse et intense de la chute de leurs cheveux, habituellement associée à une perte de volume mais sans perte évidente de densité et sans cause identifiée : on parle alors d'effluvium télogène chronique (ETC). Ce dernier peut être associé, d'une part à la miniaturisation du follicule, ce qui suggère que l'alopécie androgénétique, à son stade précoce, est responsable d'une chute de cheveux excessive chez la majorité de sujets (Sinclair, 2004) ; d'autre part à une déficience en fer, mais cette hypothèse est controversée.

Les premiers travaux sur une grande cohorte de femmes (plus de 1000 femmes) ont permis de définir une faible réserve en fer quand le taux sérique de ferritine était compris entre 15µg/L et 30 µg/L, et une carence totale en fer quand le taux sérique en ferritine était inférieur à 15µg/L (Milman et Kirchhoff, 1994). Selon Rushton, le seuil critique sous lequel on observe une augmentation de l'effluvium télogène est de 40µg/L. Néanmoins, le lien direct entre l'ETC et le taux sérique en ferritine n'a pas pu être confirmé par d'autres études (Sinclair, 2002).

2.4.1 Question posée

Grâce à l'accès à une très grande cohorte de volontaires (plus de 5000 femmes), nous avons recherché s'il existait un lien entre chute de cheveux et réserves en fer évaluées à partir du dosage du fer sérique chez la femme non ménopausée.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue European Journal of Dermatology (**Annexe 3**).

C.Deloche, P. Bastien, S. Chadoutaud, P. Galan, S. Bertrais, S. Herberg, O.de Lacharrière (2007) *Low iron stores: a risk factor for excessive hair loss in non-menopausal women*. Eur J Dermatol ,17 (6):1-6.

2.4.2 Abstract

Iron deficiency has been suspected to represent one of the possible causes of excessive hair loss in women. The aim of our study was to assess this relationship in a very large population of 5110 women aged between 35 and 60 years. Hair loss was evaluated using a standardized questionnaire sent to all volunteers. The iron status was assessed by a serum ferritin assay carried out in each volunteer. Multivariate analysis allowed us to identify three categories: "absence of hair loss" (43%), "moderate hair loss" (48%) and "excessive hair loss" (9%). Among the women affected by excessive hair loss, a larger proportion of women (59%) had low iron stores (< 40 µg/L) compared to the remainder of the population (48%). Analysis of variance and logistic regression show that a low iron store represents a risk factor for hair loss in non-menopausal women.

2.4.3 Résultats et Conclusion

Nous avons caractérisé la chute de cheveux chez la femme non ménopausée selon une classification en trois groupes : absence de chute (41,5%); chute modérée (48,6%) ; chute excessive (10%) (**Figure 94**).

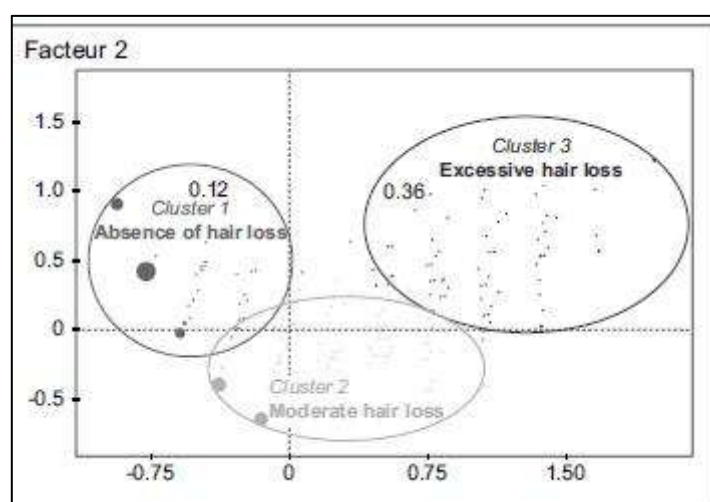


Figure 94 - Analyse en composante multivariée

Classification de la chute des cheveux chez la femme ménopausée en 3 classes

Puis, une analyse de variance nous a permis d'évaluer la contribution de chaque groupe dans la variation du fer sérique. Le test de Tukey-kramer de comparaison par paires a montré des différences significatives entre les groupes « chute de cheveux excessive » et « pas de chute » ($p=0,02$) ou « chute modérée » ($p=0,01$) (**Figure 95**).

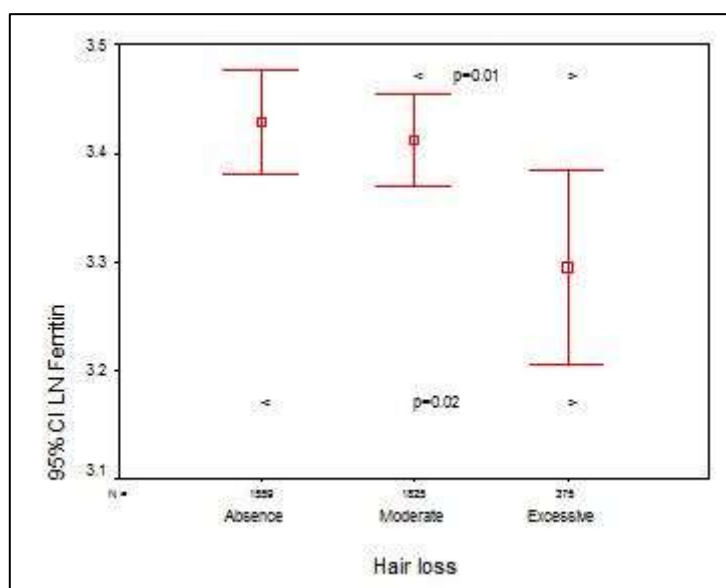


Figure 95 - Variation du taux de ferritine sérique ($\mu\text{g/L}$) en fonction de la sévérité de la chute chez la femme non ménopausée

Nos données révèlent que chez les femmes non ménopausées présentant une déplétion en fer ($\leq 15 \mu\text{g/L}$) ou des réserves faibles en fer ($\leq 40 \mu\text{g/L}$), la chute des cheveux excessive est significativement plus fréquente (11,4% et 10,2% respectivement) que celles ayant un taux optimal de ferritine sérique ($>70 \mu\text{g/L}$) (6,8%).

Enfin, grâce à une analyse de variance (ANOVA) et de régression logistique, nous avons montré que des taux sériques de ferritine bas représentaient un facteur de risque chez la femme non ménopausée. Par exemple, une diminution de 30 unités du taux de ferritine sérique est associée à une augmentation de 28% du risque d'une chute de cheveux excessive (**Figure 96**).

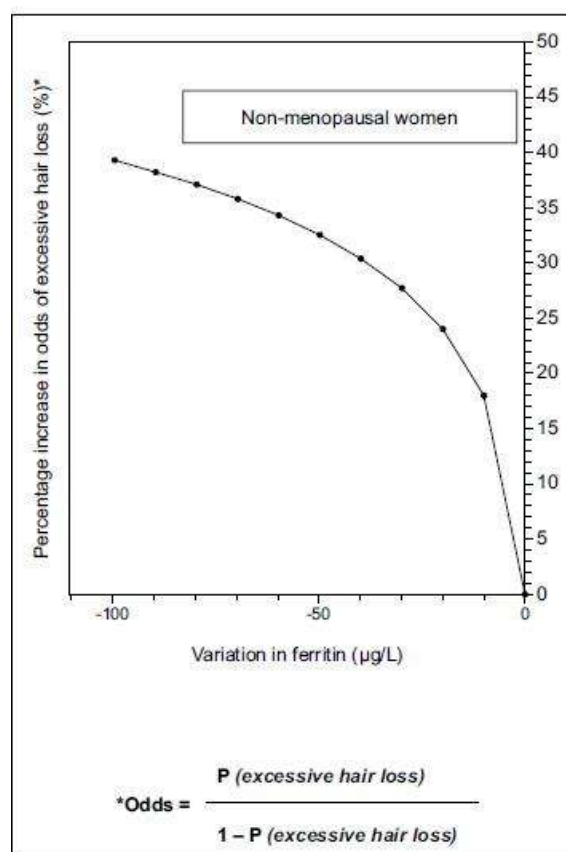


Figure 96 - Modèle prédictif de la chute des cheveux en fonction du taux sérique de ferritine

Nos travaux réalisés sur un très grand nombre de volontaires renforcent ceux qui montrent un lien entre la chute des cheveux et le statut des réserves en fer chez la femme non ménopausée. La controverse qui existe sur l'existence ou non de ce lien pourrait s'expliquer par des différences et des biais dans la méthodologie. L'intérêt de notre étude réside dans le fait qu'aucune des études précédant la nôtre n'a été réalisée sur un si grand nombre de volontaires. De plus, nos données ont été ajustées sur des variables, telles que l'utilisation chez les femmes non ménopausées de dispositifs contraceptifs intra-utérins dont on sait qu'ils influencent l'analyse. En effet, les femmes ayant recours à ces dispositifs ont des taux de ferritine sérique inférieurs à celles qui utilisent soit une contraception orale, soit aucune contraception (Galan, 1998). Toutefois, une faiblesse de notre étude pourrait résulter dans la méthodologie au niveau de la collecte des données sur la chute des cheveux (questionnaire

adressé aux volontaires) qui est compensée par le modèle de régression logistique montrant l'existence d'un lien entre la chute des cheveux et le taux de ferritine sérique.

Au final, il n'en reste pas moins que ce type de chute lié au statut en fer reste marginal. Selon Olsen, le choix de la valeur du seuil en ferritine égal à 15µg/L est très important pour étudier les causes de la déficience en fer dans la population. Ses travaux n'ont pas mis en évidence de lien entre la chute des cheveux (AGA ou ETC) et le taux en ferritine sérique en référence à un groupe contrôle (Olsen, 2010).

Selon Rushton, l'étude d'Olsen comporte plusieurs biais au niveau méthodologique (les échantillons de sang n'étaient pas standardisés, par exemple) et leur conclusion sur l'absence de lien n'est pas le reflet exact de leurs résultats statistiques (Rushton, 2011). De plus, il considère que la problématique n'est pas tant la relation entre le statut en fer et la perte des cheveux, puisque des études qu'il a réalisées, dont une en double aveugle contre placebo, ont montré des réponses significatives à une supplémentation de fer (72 mg) après six mois de traitement. Les « vraies questions » selon lui seraient celles-ci: i) quelle est la valeur-seuil de la concentration en ferritine sérique nécessaire pour optimiser la réponse au traitement ? - 40µg/l semble correspondre à cette concentration minimale (Rushton et Ramsay, 1992)- ; ii) quel est le taux de la supplémentation recommandée pour maintenir des concentrations en ferritine sérique au-delà de 70µg/l? - les taux actuellement recommandés chez la femme non ménopausée seraient entre 24 et 48 mg de fer journalier- iii) ; pourquoi certains sujets ayant des taux bas en fer sérique ne développent-ils pas d'ETC?

Seules de nouvelles études indépendantes, en double aveugle et contre placebo chez l'homme, confirmant qu'une supplémentation en fer est capable de restaurer la croissance des cheveux, pourraient stopper cette controverse. Dans ce sens, nos travaux, grâce au modèle de régression logistique, permettent de conclure qu'il existe un lien entre la chute des cheveux et l'ETC chez la femme non ménopausée.

En résumé,

L'ensemble de nos travaux sur «le vieillissement du cheveu» a permis d'établir un lien entre les paramètres biologiques et cliniques:

***Infiltrats inflammatoires/Signes péripilaires**

***Miniaturisation des follicules /Diversité des diamètres**

***Statut en fer /Chute des cheveux chez la femme non ménopausée**

Bien que des études soient encore nécessaires pour bien comprendre la pathogénie des PPS par exemple (Piraccini, 2014), nos travaux ont permis d'enrichir la sémiologie du scalp et de proposer aux dermatologues de nouvelles méthodes d'évaluation par des échelles cliniques faciles à mettre en œuvre en pratique clinique courante.

A côté de cet organe qu'est le cheveu, dont on vient d'appréhender la complexité du vieillissement aussi bien chez les hommes que chez la femme à travers la chute des cheveux, nous nous sommes aussi intéressés au vieillissement de la peau chez la femme ménopausée chez laquelle les effets de l'âge sont particulièrement accentués.

3 TRAVAUX DE RECHERCHE SUR LE VIEILLISSEMENT DE LA PEAU

3.1 CONTEXTE

Les modifications de la peau observées à la ménopause s'apparentent à celles observées au cours du vieillissement chronologique. Elle devient plus fine, plus sèche et plus sensible, associée à des sensations de tiraillement (Paquet, 1987). Il existe une diminution de la teneur du derme en collagènes qui reflète la perte osseuse post-ménopausique (Brincat, 1987 ; Castelo-Branco, 1994). Il existe également une augmentation de la perte d'eau percutanée liée aux altérations physicochimiques de la couche cornée en surface, qui devient plus épaisse et plus compacte (Henry, 1997). Tous ces changements aboutissent à une perte d'élasticité, de fermeté et à une augmentation du nombre de rides. Du fait que ces changements semblent être accélérés (plus fréquents et/ou plus intenses) à la ménopause, d'aucuns ont évoqué la participation hormonale liée à la perte de production des stéroïdes sexuels. En effet, la **carence œstrogénique** semble responsable d'une accentuation de certains signes du vieillissement cutané lors de la ménopause, et même de la péri-ménopause, sans que l'on puisse affirmer un véritable vieillissement cutané ménopausique.

La concentration plasmatique de la DHEA (déhydroépiandrostérone) et de ses dérivés évoluent au cours de la vie. Les concentrations les plus élevées s'observent entre 18 et 45 ans avec une décroissance avec l'âge. La décroissance la plus importante est observée d'une part aux alentours de 20-30 ans, d'autre part vers 50-60 ans, avec très peu de changement au-delà de 60 ans (Labrie, 1997). Ainsi, cette diminution de la sécrétion de la DHEA a laissé présumer le rôle important de la DHEA dans les nombreux troubles associés à l'âge et à la ménopause. Cette dernière est caractérisée par une diminution des concentrations plasmatiques des œstrogènes et de la progestérone mais aussi des androgènes.

Chez la femme ménopausée, tous les œstrogènes et presque tous les androgènes sont synthétisés à partir de la DHEA (déhydroépiandrostérone) dans les tissus périphériques qui possèdent les enzymes nécessaires à la synthèse des stéroïdes actifs. Les quantités élevées de DHEA sécrétées par les surrénales chez l'homme et chez la femme permettent la synthèse de quantités importantes d'androgènes et d'estrogènes dans les tissus périphériques-cibles. Cette formation d'androgènes et d'estrogènes dans les tissus mêmes où ces stéroïdes agissent a été appelée intracrinologie (Labrie, 2005) (Figure 97).

L'administration topique ou systémique de la DHEA suscite donc un grand intérêt dans la lutte contre le vieillissement.

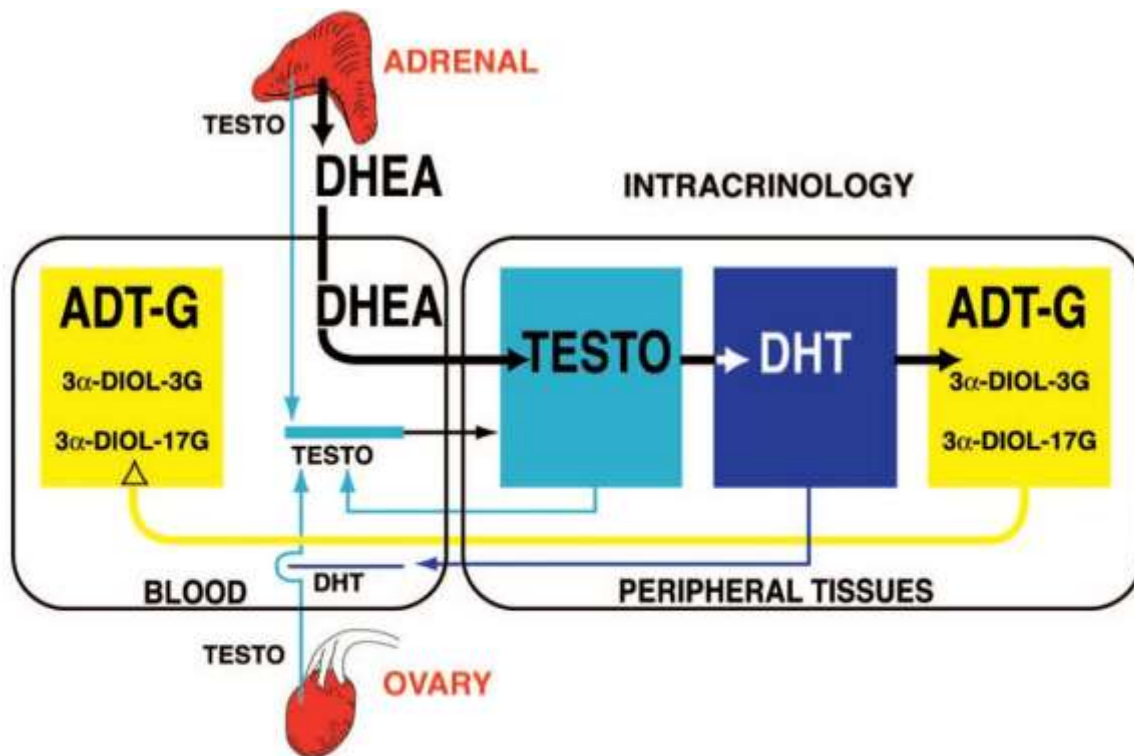


Figure 8 Schematic representation of the very important contribution of the precursor DHEA of adrenal origin to total androgenic activity in postmenopausal women with a parallel minor contribution of testosterone (TESTO) of ovarian and adrenal origins. By intracrine mechanisms, DHEA is transformed into testosterone and DHT in peripheral tissues and then into the inactive metabolites ADT and 3α-diol before transformation into the water soluble glucuronide derivatives ADT-G, 3α-diol-3 G and 3α-diol-17 G by the UGTs 2B7, 2B15 and 2B17. These water-soluble metabolites are then released into the general circulation where they can be measured. A very small proportion of the testosterone and DHT made intracellularly by the steroidogenic enzymes of the intracrine pathway diffuse into the circulation. The height of the colored boxes is proportional to the concentration of each steroid.

Figure 97 - Intracrinology (Labrie, 2005)

3.1.1 Question posée-N°1

Toutes les études citées ci-dessous ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec Endorecherche (Dr Labrie à Québec, Canada).

Quel est le stéroïde le plus approprié pour étudier le métabolisme de la DHEA?

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (**Annexe 4**).

F. Labrie, A. Bélanger, P. Bélanger, R. Bérubé, C. Martel, L. Cusan, J. Gomez, B. Candas, V. Chaussade, I. Castiel, C. Deloche and J. Leclaire. (2006) Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women. *Steroid Biochem Mol Biol.* 99(4-5):182-8.

3.1.2 Abstract

Abstract

Despite the long series of cohort studies performed during the last 20 years, the correlation between serum testosterone and any clinical situation believed to be under androgen control in women has remained elusive. This is likely related to the recent finding that the androgens made locally in large amounts in peripheral tissues from the precursor dehydroepiandrosterone (DHEA) act in the same cells where synthesis takes place and are not released in significant amounts in the circulation, thus making unreliable the measurement of serum testosterone as marker of total androgenic activity. The objective is to determine if serum androgen glucuronides can be replaced by testosterone or another steroid as measure of androgenic activity.

Since the glucuronide derivatives of androgens are the obligatory route of elimination of all androgens, these metabolites were measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry under basal conditions in 377 healthy postmenopausal women aged 55–65 years as well as in 47 premenopausal women aged 30–35 years while testosterone was assayed by gas chromatography mass spectrometry. No correlation was found between the serum concentration of testosterone and that of androstosterone glucuronide (ADT-G) or androstenediol glucuronide (3 α -diol-G), the androgen metabolites which account for the total pool of androgens.

The present data show that measurement of the total pool of androgens reflected by the serum levels of ADT-G and 3 α -diol-G cannot be replaced by serum testosterone or any other steroid, including DHEA or DHEA sulphate. These findings may have implications for women with androgen deficiency involving osteoporosis, obesity, type 2 diabetes, sexual dysfunction, loss of muscular strength and a series of other clinical situations affecting women's health. Measuring ADT-G and 3 α -diol-G might identify cases of true androgen deficiency and provide an opportunity to offer appropriate androgen therapy.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

3.1.3 Résultats et Conclusion

La mesure des différents taux sériques de stéroïdes a permis de révéler l'androstérone-glucuronide (ADT-G), métabolite de la testostérone le plus abondant (i.e 93% des dérivés androgéniques glucuronés totaux) comme un marqueur de choix pour suivre l'activité androgénique chez la femme. Cette étude, réalisée grâce à une méthode validée de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), a permis de montrer que pour évaluer l'activité androgénique, il suffit de mesurer les taux de serum d'ADT-G ou 3 α -diol-G puis que c'est lui qui reflète le pool total des androgènes, la mesure de la testostérone sérique n'étant pas pertinente.

3.1.4 Question posée-N°2

Quelle est la concentration optimale de DHEA en application topique permettant de retrouver les taux physiologiques de DHEA sans toxicité systémique?

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (**Annexe 5**).

F. Labrie, A. Bélanger, P. Bélanger, R. Bérubé, C. Martel, L. Cusan, J. Gomez, B. Candas, V. Chaussade, I. Castiel, C. Deloche and J. Leclaire (2007) Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration. J. Steroid Biochem Mol Biol 103(2):178-88.

3.1.5 Abstract

Abstract

The marked decline in serum dehydroepiandrosterone (DHEA) with age is believed to play a role in health problems associated with aging, these health issues being potentially preventable or reversible by the exogenous administration of DHEA.

In the present study, liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry (LC/MS/MS) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) were used to measure the serum levels of DHEA and 11 of its metabolites in seventy-five 60–65-year-old Caucasian women who received 3 g of 0.1%, 0.3%, 1.0% or 2.0% DHEA cream or placebo applied twice daily on the face, upper chest, arms and legs. The serum levels of DHEA increased 574% over control at the 2.0% DHEA dose while the sum of the androgen metabolites androstosterone glucuronide (ADT-G), 3 α -androstenediol-3G (3 α -diol-3G) and 3 α -diol-17G increased by only 231%. On the other hand, serum testosterone and dihydrosterone were increased by 192% and 275%, respectively, above basal levels compared to 139% and 158% for estrone and estradiol. Such data show that the transformation of exogenous DHEA in postmenopausal women is preferentially into androgens rather than into estrogens. On the other hand, the present data indicate that serum DHEA measurements following DHEA supplementation in postmenopausal women are an overestimate of the formation of active androgens and estrogens and suggest a decreased efficiency of transformation of DHEA into androgens and estrogens with aging.

3.1.6 Résultats et Conclusion

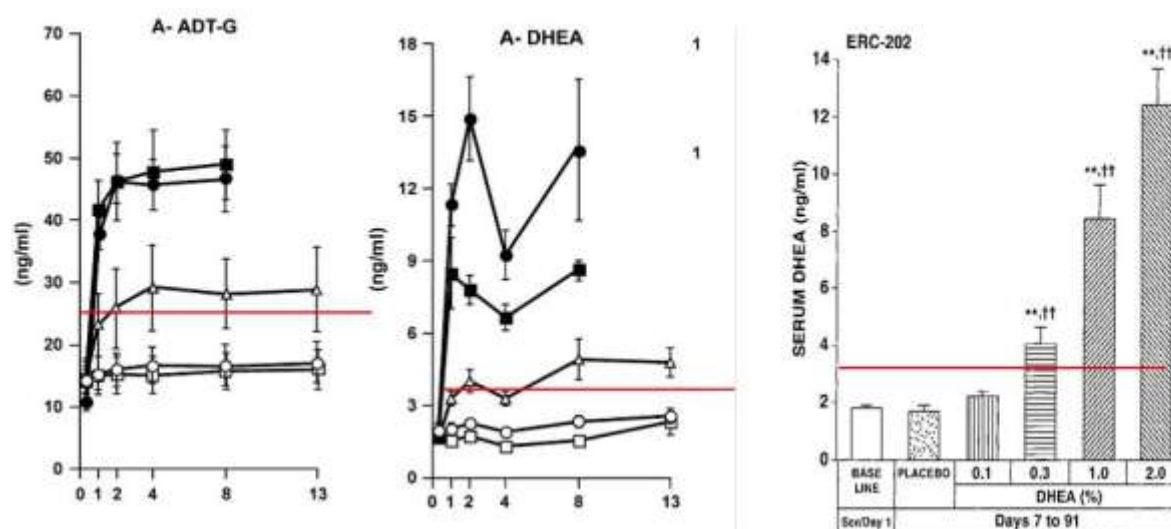


Figure 98 - Taux de serum d'androstérone glucuronide (ADT-G) et DHEA.

Application topique de DHEA pendant 13 semaines

Parmi les différentes concentrations testées de DHEA en application topique pendant 3 mois, celle correspondant à 0.3% a montré une augmentation progressive et significative de la DHEA et de l'ADT-G, avec un retour après un mois de traitement aux niveaux physiologiques de chez la femme jeune (Figure 98).

3.1.7 Question posée-N°3

La peau possédant tout l'équipement enzymatique nécessaire pour transformer la DHEA en métabolites actifs, nous avons recherché si la DHEA avait un effet clinique et biologique sur la peau (épiderme + derme).

3.1.7.1 Etape 1 - Etude clinique

L'étude d'efficacité que nous allons détailler ici vient enrichir l'ensemble des études déjà réalisées à la recherche L'Oréal, par voie orale et par voie topique (Baulieu, 2000). Il s'agit d'une large étude de connaissance aussi bien clinique que biologique, d'une durée d'un an, explorant plusieurs fonctions de la peau au moyen de différents critères d'évaluation. La concentration efficace à 0,3% de DHEA a été déterminée à partir d'une étude préliminaire dose/effet ayant duré 3 mois (Cf. 3.1.4).

L'évaluation de l'effet anti-âge de la DHEA à 0,3% par application topique a été réalisée grâce à une étude clinique randomisée en double aveugle chez des femmes ménopausées âgées de 65 à 70 ans. Cette étude a permis de mettre en évidence, sur une durée d'un an, des effets significatifs de la DHEA à 0,3% sur la peau dans le groupe traité versus le groupe témoin:

*** Sur la fonction sébacée en réactivant l'activité des glandes sébacées**

Nous avons montré i) une augmentation de la quantité des lipides de sebum, squalène et triglycérides grâce à des dosages des lipides du sébum à partir de prélèvements réalisés au niveau du front ; ii) une diminution des acides gras libres. Cette diminution associée à une augmentation des triglycérides traduit une peau moins irritée (dosage des lipides mixtes à partir de prélèvements réalisés au niveau du front).

Le traitement par application topique de DHEA induit localement une réactivation de l'activité de glandes sébacées qui étaient au repos. En effet, la sécrétion sébacée diminue avec l'âge, (Downing, 1988) avec mise au repos progressive d'un nombre important de glandes sébacées. La DHEA, en réactivant des glandes sébacées qui étaient au repos, a donc montré un effet positif sur l'assèchement de la peau.

*** Sur le contraste des taches pigmentaires**

Des mesures instrumentales, grâce à un outil de mesure développé par la recherche L'Oréal (de Rigal, 2007), ont révélé une diminution de la visibilité des taches pigmentaires sur le dos des mains (contraste des taches pigmentaires) et donc un effet positif sur l'homogénéité de la couleur de la peau. Néanmoins, les modifications significatives de la pigmentation ne concernent que la diminution du contraste du paramètre clarté au niveau d'une zone (dos des mains). Les résultats déjà publiés (Nouveau, 2008) concernant les évaluations des taches pigmentaires à partir d'échelles cliniques (scores) n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet significatif du traitement. Cependant, l'évaluation de la couleur de la peau par chromamétrie (Baulieu, 2000) a permis de montrer que la DHEA entraînait une diminution significative de la pigmentation sur le visage. Pour autant, ces résultats ne peuvent pas être comparés à ceux de notre étude car les outils d'évaluation ne sont pas comparables.

* Sur l'épaississement de la peau et une diminution de l'hétérogénéité du derme

Les mesures réalisées à l'aide de l'échographie 25 Mhz sur la face externe du bras (paramètres morphologiques et d'échogénicité) ont permis de montrer un léger épaississement de la peau (épiderme + derme) et une diminution de l'hétérogénéité du derme. Ces deux évolutions vont dans le sens opposé aux évolutions induites par le vieillissement (diminution de l'épaisseur de peau (Batisse, 2002 ; Gniadecka, 1998) et augmentation de l'hétérogénéité dans le derme avec l'apparition de la SENE. Même si les variations observées sont faibles, ces résultats montrent que la DHEA pourrait avoir un rôle anti-âge en induisant une légère augmentation de l'épaisseur de la peau et une réhomogénéisation du derme.

En conclusion, cette étude exploratoire -qui a porté sur un an- montre une efficacité de la DHEA malgré la faible concentration de DHEA. Ces résultats incitent fortement à concevoir de nouvelles études plus ciblées autour des effets spécifiques de la DHEA sur les taches pigmentaires et les rides.

Afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques associés aux signes cliniques observés, nous avons réalisé deux approches complémentaires, transcriptomique et immunohistologique. Commençons tout d'abord par l'approche transcriptomique qui permet de mieux caractériser les événements moléculaires qui sous-tendent les effets de la DHEA.

3.1.7.2 Etape 2 - Etudes biologiques

3.1.7.2.1 Approche transcriptomique

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (**Annexe 6**):

E.Calvo , V. Luu-The , J. Morisset, C. Martel , C. Labrie, B. Bernard, F. Bernerd, C. Deloche, V. Chaussade, J. Leclaire, F. Labrie. (2008) Pangenomic changes induced by DHEA in the skin of postmenopausal women. J. Steroid Biochem.Mol.Biol 112:186-193.

3.1.7.2.2 Abstract

A B S T R A C T

The objective of this study was to explore, for the first time, the changes in the pangenomic profile induced in human skin in women treated with dehydroepiandrosterone (DHEA) applied locally.

Sixty postmenopausal women participated in this phase II prospective, randomized, double-blind and placebo-controlled study. Women were randomized to the twice daily local application of 0% (placebo), 0.3%, 1% or 2% DHEA cream. Changes in the pangenomic expression profile were studied using Affymetrix Genechips.

Significant changes ($p < 0.05$) in sixty-six DHEA-responsive probe sets corresponding to 52 well-characterized genes and 9 unknown gene sequences were identified. A dose-dependent increase in the expression of several members of the collagen family was observed, namely COL1, COL3 and COL5 as well as the concomitant modulation of SPARC, a gene required for the normal deposition and maturation of collagen fibrils in the dermis. Several genes involved in the proliferation and differentiation of keratinocytes were also modulated. In addition, topical DHEA reduced the expression of genes associated with the terminal differentiation and cornification of keratinocytes.

Our results strongly suggest the possibility that DHEA could exert an anti-aging effect in the skin through stimulation of collagen biosynthesis, improved structural organization of the dermis while modulating keratinocyte metabolism.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

3.1.7.2.3 *Résultats et Conclusion*

Cette approche transcriptomique a permis de montrer que le traitement topique de la DHEA à plusieurs concentrations modulait l'expression de plusieurs gènes dermiques et épidermiques, tels que plusieurs membres de gènes de la famille des collagènes et de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération et différenciation des kératinocytes. Il en résulte une augmentation du turn-over épidermique soit directement, soit indirectement en réponse à un effet dermique. D'autres gènes associés au programme de différenciation épidermique (K1B, LEP7) voient leur expression réprimée, de même que des gènes de cornification et d'adhésion au niveau des jonctions serrées (**Tableau 8; Figure 99 et Figure 100**).

Nom du gène	Principaux groupes fonctionnels modulés
↑COL1A1, COL5A2, SPARC	Matrice extra cellulaire
↑MRP8 (calgranuline A) & MRP14 (calgranuline B)	Turn over épidermique
↑ERbeta / Protéine ligand du récepteur aux androgènes ↑Serpin B3 / Inhibiteur de la protéase à Sérine	Prolifération / Différenciation
↓Keratin 1B, JAG1,LEP7 ↓SPRR2G/ Small proline-rich protein 2G ↓LEP7/Protéine 7	Différenciation terminale
SPRR2G/ Small proline-rich protein 2G	Cornification
↑KNTC2L / Kinétochore 2 ↑RRM2 / Polypeptide ribonucléotide réductase ↑DNASE1L3/ Désoxyribonucléase	Prolifération cellulaire

Tableau 8 - Principaux groupes fonctionnels modulés par la DHEA

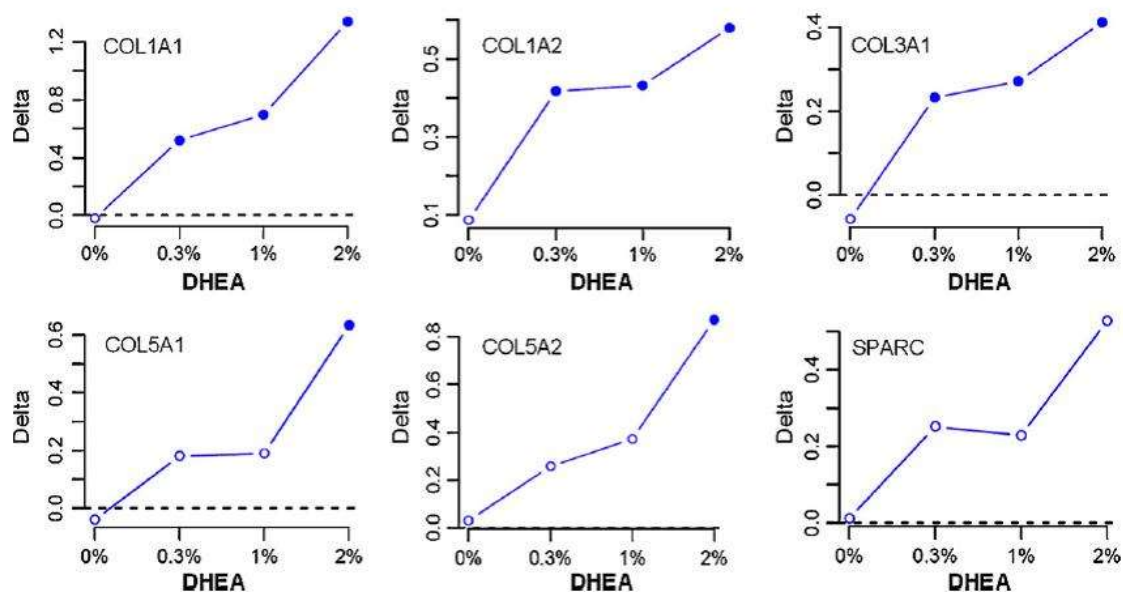


Figure 99 - Stimulation de l'expression des gènes dermiques par la DHEA.

Application topique de DHEA pendant 13 semaines à différentes doses : 0,1% ; 0,3% ; 1% ; 2%.

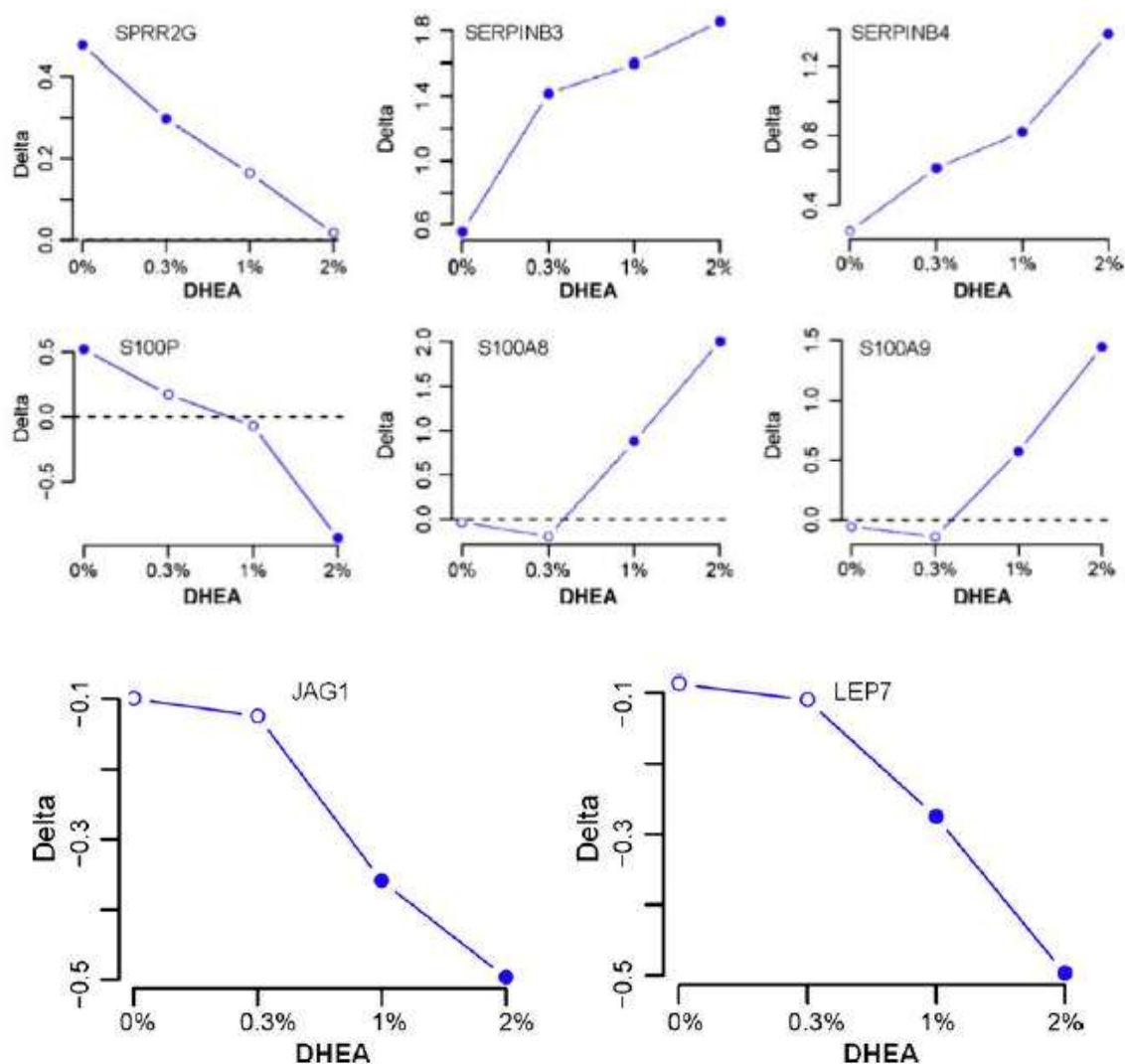


Figure 100 - Stimulation de l'expression des gènes épidermiques par la DHEA
Application topique de DHEA pendant 13 semaines à différentes doses : 0,1% ; 0,3% ; 1% ; 2%.

Bien que cette approche sans a priori nous ait permis d'attribuer des signatures moléculaires de la DHEA, il n'en reste pas moins qu'elle ne reflète que l'expression des messagers. Mais que se passe t-il dans la réalité au niveau de l'expression des protéines dans les différents compartiments de la peau? Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une étude *in vivo* incluant une analyse immunohistologique.

3.1.7.2.4 Approche histologique

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue British Journal of Dermatology (Annexe 7) :

C. Deloche, M. El-Alfy, L. Azzi, BA. Bernard, F. Bernerd, J. Coutet, V. Chaussade, C. Martel, J. Leclaire, F. Labrie (2010) Skin responses to topical dehydroepiandrosterone: implications in antiageing treatment? *Br J Dermatol* 163:968-976.

3.1.7.2.5 Abstract

Summary

Background Although low dehydroepiandrosterone (DHEA) is suspected to have a role in skin ageing, little information is available on the mechanisms potentially involved.

Objectives To obtain information on androgen receptor (AR) and procollagen expression in ageing skin during DHEA treatment.

Methods A placebo-controlled, randomized, prospective study was performed with 75 postmenopausal women aged 60–65 years. The women were treated twice daily for 13 weeks with 3.0 mL of placebo or 0.1%, 0.3%, 1% or 2% DHEA cream applied on the face, arms, back of hands, upper chest and right thigh where 2-mm biopsies were collected before and after treatment.

Results Although the overall structure of the epidermis was not significantly affected at the light microscopy level, AR expression examined by immunocytochemistry was markedly increased by DHEA treatment. In the dermis, the expression levels of procollagen 1 and 3 mRNA estimated by *in situ* hybridization were increased by DHEA treatment. In addition, the expression of heat shock protein (HSP) 47, a molecule believed to have chaperone-like functions potentially affecting procollagen biosynthesis, was also found by immunocytochemistry evaluation to be increased, especially at the two highest DHEA doses.

Conclusion These data suggest the possibility that topical DHEA could be used as an efficient and physiological antiageing skin agent.

3.1.7.2.6 Résultats et Conclusion

Au niveau de l'épiderme, les immuno-marquages des récepteurs aux androgènes (AR) ont montré que l'intensité du marquage et le nombre de noyaux marqués sont plus élevés après 13 semaines de traitement avec la DHEA (**Figure 101**). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude clinique qui a montré l'augmentation de l'activité de la sécrétion sébacée, puisque nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de l'expression des ARs. En effet, il y a beaucoup de récepteurs aux androgènes dans les glandes sébacées (Blauër, 1991) ce qui en fait une cible particulièrement sensible aux androgènes. Ces résultats, à la lumière de ceux décrivant la présence dans la peau de la majorité des enzymes stéroïdiennes (Dumont, 1992 ; Labrie, 2005), sont en accord avec le postulat que la peau humaine serait capable de synthétiser à partir de la DHEA une quantité significative de stéroïdes sexuels.

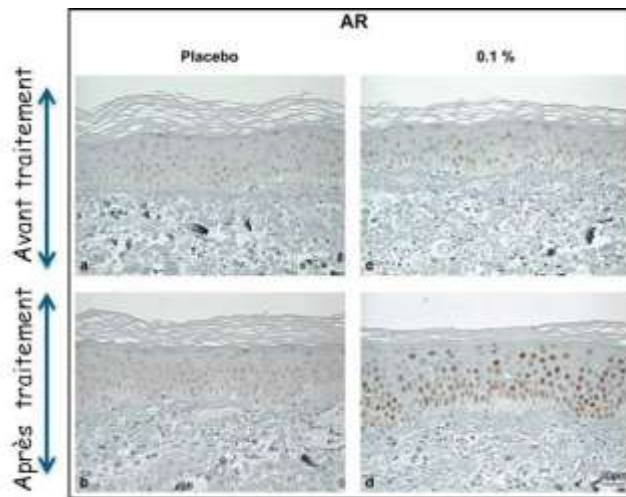


Figure 101 - Immunomarquage avec des anticorps des récepteurs aux androgènes

Ces résultats histologiques sont donc la signature d'une activité de la DHEA au niveau épidermique sur la synthèse des récepteurs aux androgènes en accord avec la traduction clinique de reprise de la sécrétion sébacée.

Au niveau du derme, l'immunomarquage de HSP47 a montré une augmentation significative de cette protéine chaperonne de la synthèse du collagène 1 (caractère précoce de la régulation de la matrice extracellulaire) (**Figure 102**).

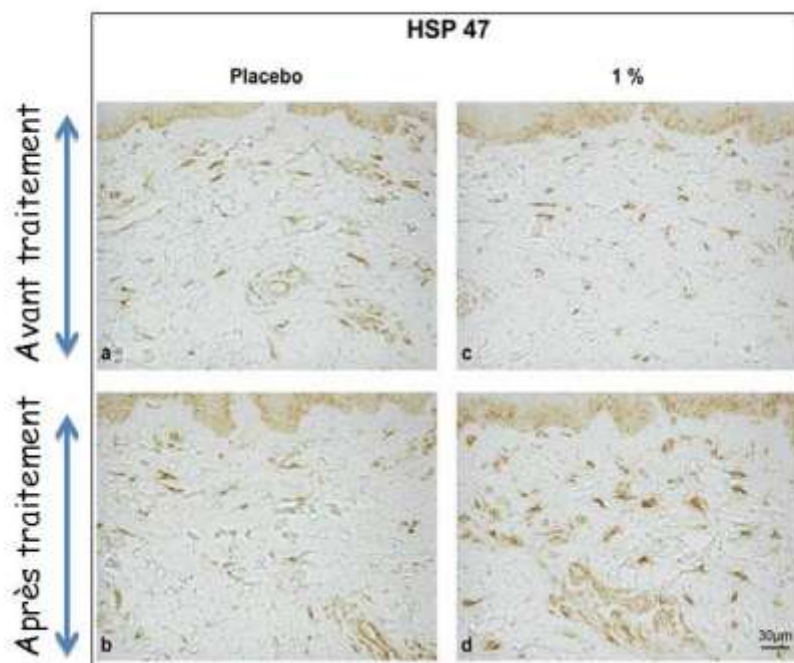


Figure 102 - Immunomarquage avec des anticorps des heat shok protéines

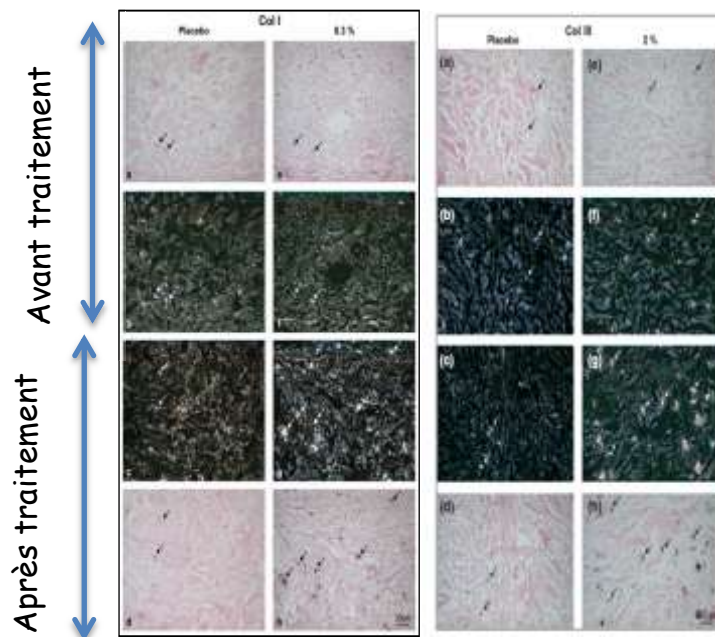


Figure 103 - Hybridation *in situ* avec des probes cARN de collagène I et III

De plus, l'hybridation *in situ* a montré une nette augmentation des mRNA de procol1 (marqueur du derme papillaire) et de procol3 (marqueur du derme papillaire et de la partie supérieure du derme réticulaire), lesquels sont souvent coexprimés (**Figure 103**).

Parmi les différents types de collagène, le collagène 1 présent majoritairement dans le derme (plus de 90%) présente un rôle crucial dans l'intégrité structurelle du derme. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude récente où les auteurs ont rapporté une augmentation significative de procollagène $\alpha 1$, aussi bien chez des sujets jeunes que chez des sujets âgés, après 4 semaines d'application topique de DHEA à 5% (Shin, 2005).

Au final, même si l'ensemble de ces modifications aux niveaux transcriptomique et protéomique ne sont pas traduites par des modifications cliniquement perceptibles des rides de la patte d'oie et/ou des lèvres, elles constituent néanmoins une signature de l'activité de la DHEA dans le derme.

En résumé,

L'ensemble des résultats de ces études d'efficacité clinique et biologique ont permis :

- *de confirmer les effets cliniques déjà connus de la DHEA sur la fonction sébacée**
- *de confirmer des tendances observées dans les études réalisées par l'Oréal, par voie orale et par voie topique (Beaulieu, 2000, Nouveau, 2008).**
- *d'attribuer une signature de la DHEA en application topique tant au niveau épidermique qu'au niveau dermique.**

Ces résultats incitent fortement à concevoir de nouvelles études plus ciblées autour des effets spécifiques de la DHEA sur les taches pigmentaires et les rides. Elles pourraient être réalisées avec une concentration plus élevée de DHEA pour augmenter les modifications cliniques, et peut-être détecter des effets restés infracliniques dans nos travaux. Comme nous avons montré que les effets de l'application cutanée de DHEA étaient dose-dépendants, la concentration optimale reste à déterminer pour obtenir des effets cliniques visibles.

Aujourd'hui, les experts de l'Agence Nationale de la Santé considèrent que les études disponibles, y compris l'étude DHEAge (Beaulieu, 2000), n'apportent pas des preuves suffisantes de l'efficacité de la DHEA pour son utilisation dans la lutte contre le vieillissement. Les propriétés prêtées à la DHEA n'ont pas été établies de façon indiscutable et des essais complémentaires doivent encore être menés. Par ailleurs, du fait de sa transformation hormonale, elle peut favoriser ou aggraver les cancers hormonodépendants (sein, utérus...). Chez la femme ménopausée, seuls les traitements hormonaux substitutifs (TSH) semblent permettre d'éviter l'atrophie cutanée pour prévenir le vieillissement intrinsèque. Des études fondées sur des techniques non invasives (échographie ultrasonique, évaluations cliniques par des dermatologues) et invasives (biopsies cutanées) ont montré une correction de la sécheresse cutanée, la diminution des rides, l'amincissement cutané et de l'atrophie dermique sur peau non photoexposée, ainsi que de la perte du collagène du derme (Callens, 1996 ; Maheux, 1994 ; Savvas, 1993 ; Dunn, 1997). En revanche, l'absence d'effet trophique sur l'épiderme pourrait être liée à l'absence de récepteurs aux estrogènes sur les kératinocytes épidermiques, récepteurs dont la présence n'a jusque-là pas été démontrée.

A ce jour, nos études d'efficacité clinique et biologique sur la DHEA ouvrent de nouvelles pistes pour l'identification de nouveaux ingrédients cosmétiques mimétiques de la DHEA

A la lumière de l'état des connaissances sur la peau de la femme ménopausée et devant le faible nombre d'actifs capables d'effets biologiques (vitamine A, Vitamine C par exemple) sur les cellules cutanées, la Recherche l'Oréal cherche à développer des molécules capables de cibler, à travers ses trois compartiments, l'architecture globale de la peau, garante de l'homéostasie cutanée. A cet égard, nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation des effets histologiques d'une nouvelle molécule récemment synthétisée par notre recherche, un dérivé du xylose, le C- β -D xylopiranoside-2-hydroxy-propane (C-Xyloside) sur la peau des femmes ménopausées.

4 AUTRES TRAVAUX DE RECHERCHE SUR LE VIEILLISSEMENT

4.1 CONTEXTE

Le compartiment la JDE composé majoritairement de GAGs est essentiel au maintien de l'intégrité de l'architecture de la peau c'est à dire de la cohésion entre l'épiderme et le derme contribuant ainsi au maintien de la fermeté et de la densité, signes-clés du vieillissement. Ainsi, nous avons voulu confirmer *in vivo* des données *vitro* acquises en interne qui montraient que le C-Xyloside améliorait d'une part l'ultrastructure de la JDE par microscopie électronique et qu'il était capable de favoriser l'expression de marqueurs d'ancrage de la membrane basale tels que la laminin 332 et des composants de ces récepteurs (intégrines $\alpha 6$) ainsi que de marqueurs dans la régulation de l'homéostasie épidermique comme CD44, ce dernier étant spécifiquement impliqué dans la cohésion des kératinocytes basaux.

4.2 Question posée

Existe-t-il des molécules capables de cibler l'architecture globale de la peau dans le but de maintenir l'homéostasie tissulaire et le fonctionnement optimal de la peau?

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une étude clinique contre placebo.

L'ensemble de ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue European Journal of Dermatology (**Annexe 8**):

C.Deloche, AM Minondo, BA Bernard, F. Bernerd, F. Salas, J. Garnier, E.Tancrède. (2011) *Effect of C-xyloside on morphogenesis of the dermal epidermal junction in aged female skin. An ultrastructural pilot study.* Eur J Dermatol 21(2):191-196.

4.3 Abstract

A placebo-controlled randomized pilot study was performed on five postmenopausal women aged from 60 to 75 years. The women applied 320 mg (2 mg/cm²) of either placebo or 10% C- β -D-xylopyranoside-2-hydroxy-propane (C-xyloside) cream to each outer forearm twice daily for 3 months. At the end of the treatment, skin biopsies were collected from application areas on both forearms. Transmission electron microscope examinations revealed skin ultrastructural changes at the dermal epidermal junction (DEJ) after 10% C-xyloside application for 3 months. The morphological appearance of the DEJ showed strong improvements, with more homogeneous and regular lamina densa in the C-xyloside-treated compared to the placebo treated skin areas. The number of zones showing basement membrane re-duplication was indeed strikingly reduced on C-xyloside-treated skin. These ultrastructural results were further confirmed by a statistically significant increase in the expression levels of $\alpha 6$ -integrin and laminin-332, as estimated by immunohistochemistry. Altogether, these data suggest that topical C-xyloside application *in vivo* may be efficient in inducing a better dermal-epidermal cohesion when such a junction is deficient, as is the case in photo-aged or chronologically aged skin. Moreover, a statistically significant increase in CD44 expression was noted in the epidermis of C-xyloside-treated compared to the placebo treated skin areas.

4.4 Résultats et Conclusion

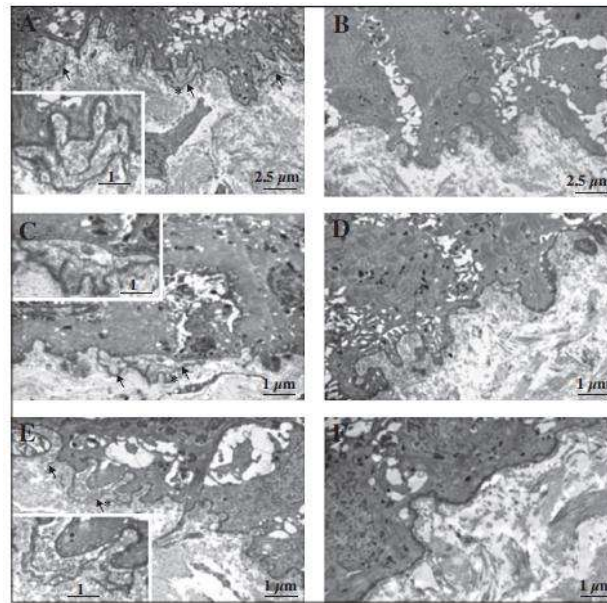


Figure 104 - Microscopie électronique à transmission

A gauche : A, C, E – nombreuses zones de déduplication de la lamina densa (JDE).

A droite : B, D, F – amélioration de l'apparence de la structure de la Lamina densa après trois mois de traitement topique avec le C-Xyloside.

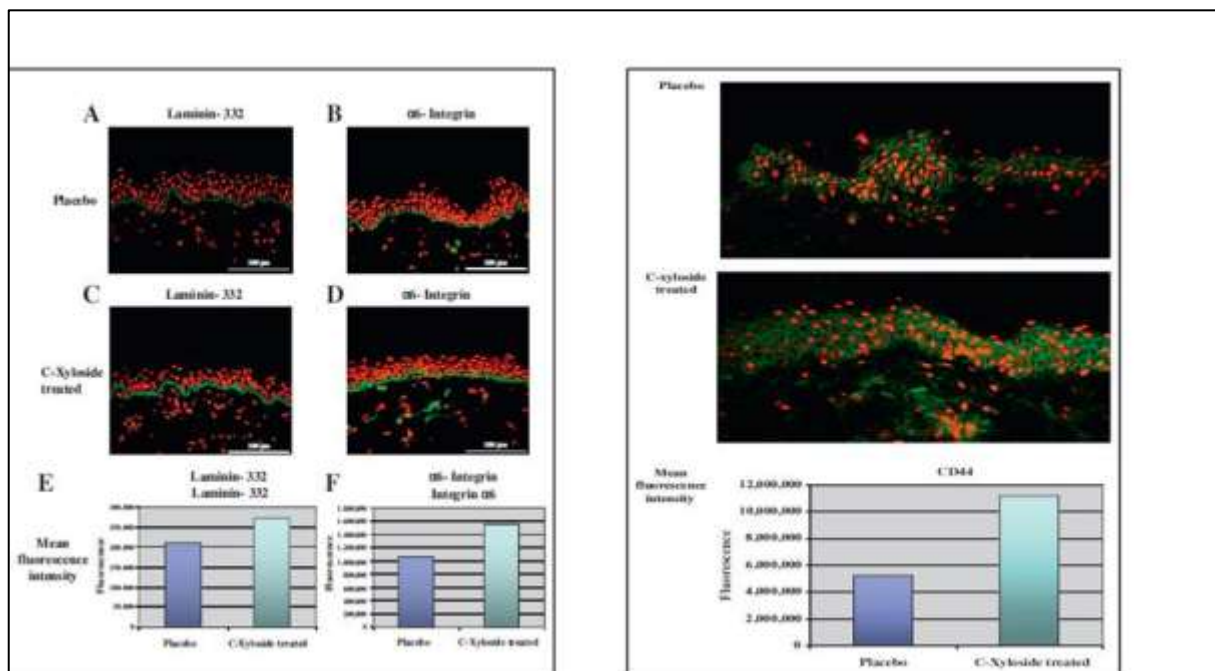


Figure 105 - Caractérisation immunohistologique des marqueurs de la jonction dermo épidermique et de l'épiderme

A gauche : augmentation des niveaux d'expression de la laminine-332 et α6-intégrine

A droite : augmentation du niveau d'expression de CD44

Nous avons montré que le C-Xyloside en application topique pendant 3 mois améliore non seulement la cohésion de la JDE (**Figure 104**), mais aussi l'expression épidermique de CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique) (**Figure 105**). Ce précurseur de glycosaminoglycane

représente une nouvelle classe d'actifs susceptibles de cibler simultanément les trois compartiments de la peau pour apporter une réponse globale au vieillissement cutané en maintenant l'homéostasie tissulaire essentielle aux échanges entre les différents compartiments qui garantissent le fonctionnement optimal de la peau.

5 DISCUSSION GENERALE

Lutter contre le vieillissement humain et en repousser les limites représentent des enjeux cruciaux dans nos sociétés industrialisées vieillissantes.

Le vieillissement prend des formes et des rythmes très variables selon les individus. Il est caractérisé par des changements interconnectés, à la fois moléculaires, cellulaires et fonctionnels. Les différents mécanismes cellulaires de réparation, de défense et de maintien de l'homéostasie, continuellement activés au cours de la vie, permettent d'établir un équilibre temporaire face aux agressions permanentes endogènes et exogènes, et d'assurer une longévité maximale. Chez l'être humain, l'étude du vieillissement est difficile car elle nécessite d'avoir accès aux cellules, aux organes et aux tissus, ce qui pose souvent non seulement des difficultés techniques, mais aussi un problème éthique. De plus, les études chez l'homme sont difficiles à reproduire et coûteuses. Dans ce contexte, le cheveu et la peau, directement accessibles, représentent des modèles de choix pour l'étude du vieillissement. Nonobstant les atouts de ces deux modèles, les fondamentaux de la peau et du cheveu restent à décrypter pour mieux agir et modéliser le vieillissement. C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos travaux de recherche en biologie clinique. La mise au point de nouvelles méthodes d'observation associée à l'élaboration d'outils d'évaluation (échelles cliniques) ont enrichi la sémiologie du scalp et du cheveu. De plus, nos travaux de recherche sur la peau nous ont permis de caractériser des effets anti-âge biologiques et cliniques pour offrir de nouveaux ingrédients de référence ; en effet, à ce jour il n'existe pas beaucoup d'actifs connus pour leurs effets biologiques sur les cellules cutanées.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, d'autres modèles d'étude permettent d'appréhender et de commencer à comprendre certains des mécanismes responsables du vieillissement. Les systèmes les plus utilisés pour l'étude du vieillissement sont, à côté de cellules humaines en culture *in vitro*, des organismes unicellulaires comme la levure *Saccharomyces cerevisia*, le ver nématode *Caenorhabditis elegans*, et aussi les rongeurs, tels que le rat et la souris. De petite taille et présentant de courts cycles de vie, ils permettent des expérimentations assez rapides et moins coûteuses que chez l'homme.

Par exemple, *C. elegans* est progressivement apparu comme un système modèle pour étudier les processus biologiques, et en particulier métaboliques, contrôlant la longévité. Ce modèle a permis de comprendre l'implication des voies AMPK, mTOR et IGF-1 dans le processus de vieillissement, et plusieurs études ont montré que certains de ces mécanismes pouvaient influencer le vieillissement chez les mammifères. Pour autant, malgré ses nombreux avantages, l'utilisation de *C. elegans* comme organisme modèle comporte certaines limites. En effet, certaines voies de signalisation y sont inexistantes, notamment des voies de signallement de l'immunité. Cependant, malgré ses limites, *C. elegans* peut servir de lien entre les études *in vitro* et *in vivo*, car il permet d'obtenir des résultats dans un organisme complet, de façon simplifiée et moins fastidieuse que dans les modèles de mammifères.

Par ailleurs, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les connaissances acquises ont facilité l'étude de l'influence de l'intégrité des télomères sur la sénescence cellulaire, en particulier chez l'homme. En effet, certains constituants télomériques chez ces deux organismes présentent de grandes ressemblances fonctionnelles. Quant à la drosophile *melanogaster*, elle permet de mieux appréhender le champ prometteur de l'épigénétique, par exemple de comprendre le rôle de la dynamique de compaction de la chromatine et des protéines du groupe Polycomb (Schuettengruber et Cavalli, 2013).

De façon intéressante, la longévité du rat taupe nu, soit d'environ 30 ans, représente un modèle très intéressant pour les chercheurs. Récemment, des auteurs viennent d'identifier un facteur cytosolique qui active la fonction du protéasome, facteur qui protège également celle du protéasome dans les cellules humaines (Rodriguez, 2014) dont l'activité diminue au cours du vieillissement.

Enfin, d'autres modèles semblent échapper au vieillissement, si l'on considère que l'augmentation de la mortalité avec le temps constitue l'une des spécificités du vieillissement. C'est le cas de certaines espèces de homards et d'oursins qui ne semblent souffrir d'aucune forme connue de vieillissement : les causes connues de mort sont uniquement externes (prédateurs, parasites, changements trop importants de température,...).

Ainsi, la **pluralité des modèles existants et à venir permettra de mieux comprendre le vieillissement, de le modéliser et d'agir sur son processus**. En effet, c'est l'ensemble des recherches utilisant des modèles variés, comme la drosophile, le nématode *C. elegans*, la souris et la levure, qui a révélé l'existence de marqueurs communs et de voies consensuelles contrôlant le vieillissement cellulaire. En outre, le recours à des techniques variées, par exemple l'utilisation de la transcriptomique - technique sans a priori- associée à des études fonctionnelles, est aussi essentiel pour une approche globale et intégrée du vieillissement. **C'est grâce à la multidisciplinarité associée aux différentes études que des voies de signalisation, des mécanismes moléculaires et des réseaux d'interactions tissulaires pourront être caractérisés et interconnectés afin de répondre à la nature multifactorielle et globale du vieillissement.**

Parmi les nombreux marqueurs associés à la longévité, ceux observés en réponse à la restriction calorique semblent particulièrement pertinents, puisqu'ils sont décrits dans de nombreuses espèces (voie de l'insuline et IGF1, signalisation mTOR, AMP kinase) et parfois chez certains types cellulaires humains, comme c'est le cas pour la voie de l'insuline et d'IGF-1. Par ailleurs, la reconsidération du rôle des ROS au cours du vieillissement a permis l'émergence d'un nouveau postulat selon lequel la production de ROS peut être envisagée comme un signal de survie en réponse à un stress provoqué qui va entraîner l'activation de signaux compensatoires pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Ainsi, les effets bénéfiques sont étroitement liés au **concept d'hormèse** qui se définit comme une réponse adaptative des cellules ou d'un organisme à un stress modéré : celui-ci induit des mécanismes cellulaires qui protègent les cellules contre un stress ultérieur. La longévité serait ainsi strictement corrélée à l'efficacité de ces mécanismes réparateurs. En revanche, l'accumulation chronique de stress conduirait finalement à l'épuisement des mécanismes protecteurs, à l'impossibilité de s'adapter au nouvel environnement cellulaire et donc à la sénescence ainsi qu'à la mort cellulaire. Or, certains auteurs remettent en cause le dogme du rôle causal des ROS tout comme l'accumulation de dommages dans le vieillissement, car selon eux : i) il existe des données qui excluent ces hypothèses ; ii) les humains, mais aussi les organismes à longue durée de vie, ne meurent pas d'une telle accumulation ; iii) les humains ou autres mammifères meurent de maladies liées à l'âge causées par des processus cellulaires initiés par

l'hyperactivation de voies de signalisation, telles que mTOR (Blagosklonny, 2009). En effet, chez les humains, les maladies liées à l'âge sont des manifestations du vieillissement qui affectent vraiment la longévité (Blagosklony, 2011). Ces auteurs estiment que le concept d'hormèse n'est pertinent que si l'on considère TOR comme jouant un rôle central dans le processus de vieillissement (**Figure 106**).

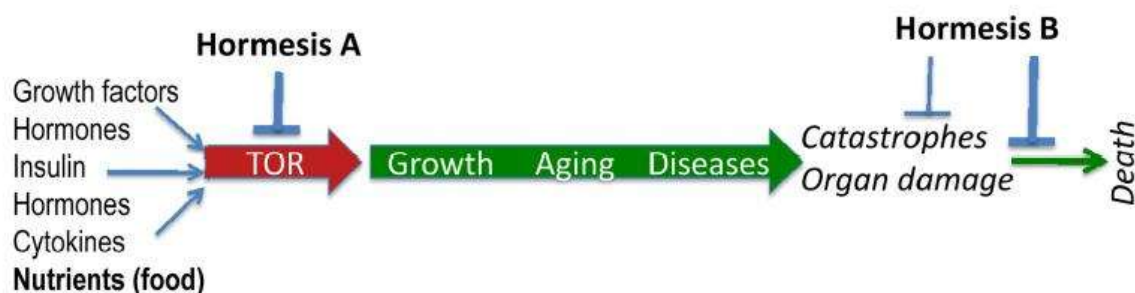


Figure 106 - Modèle de vieillissement centré sur TOR

L'Hormèse de type A inhibe TOR ralentissant le vieillissement

L'Hormèse de type B augmente la tolérance liée à l'âge et la tolérance liée aux complications dues aux maladies liées à l'âge.

Ce concept d'hormèse, qui se traduit par une réponse adaptative en augmentant la résistance au stress oxydatif, ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche, car à ce jour, s'il semble possible de moduler la durée de vie, il reste encore peu raisonnable de penser que toutes les causes de l'âge puissent être totalement inhibées. Plus particulièrement, ce concept prend tout son sens en cosmétologie, dont le champ d'action s'adresse à la normalité (**Figure 107**), au maintien de l'homéostasie, le but ultime étant de prévenir le vieillissement, la sénescence et/ou la mort cellulaire. Là encore, on notera le rôle-clé des interconnexions dans les mécanismes du vieillissement, car il semblerait que le choix de la destinée des cellules vers l'apoptose ou la sénescence pourrait être déterminé chez l'adulte par l'activité de l'axe p53-p21, le rôle de la signalisation via PTEN-PIK-AKT-mTOR et le degré des dommages macromoléculaires (Childs, 2014). De plus, Childs et al décrivent des données émergentes probantes qui soulignent l'ambivalence des mécanismes au cours du vieillissement : les cellules sénescents présentes très tôt dans la vie seraient largement bénéfiques au développement, à la régénération et à l'homéostasie, alors que leur accumulation au cours du vieillissement serait délétère, pouvant entraîner la tumorigénisation.

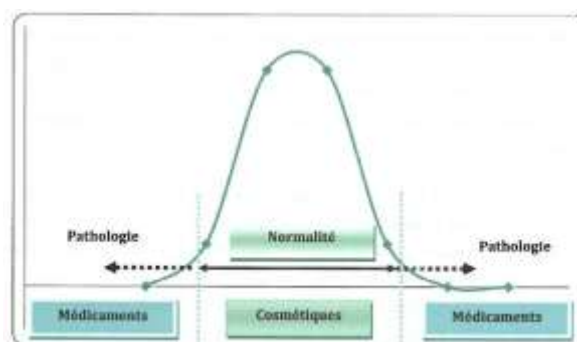


Figure 107 - Courbe de normalité

Le concept d'hormèse reste très débattu dans la communauté scientifique. C'est ainsi qu'Hekimi, tout en validant certains mécanismes moléculaires de l'hormèse, émet l'hypothèse d'un processus graduel, endogène et continu (Hekimi, 2011) (**Figure 108**). Selon cette hypothèse, la génération de ROS, sous un certain seuil, serait bien prise en charge par les mécanismes de détoxification cellulaires et, par conséquent, ne serait pas délétère. En revanche, au cours du vieillissement, au-dessus d'un certain seuil, l'accumulation de la production de ROS échapperait aux mécanismes de protection et conduirait à un processus de fuite de ROS très certainement à l'origine de l'implication des ROS dans les maladies liées à l'âge, et ce au cours de la deuxième moitié de la vie (**Figure 108**).

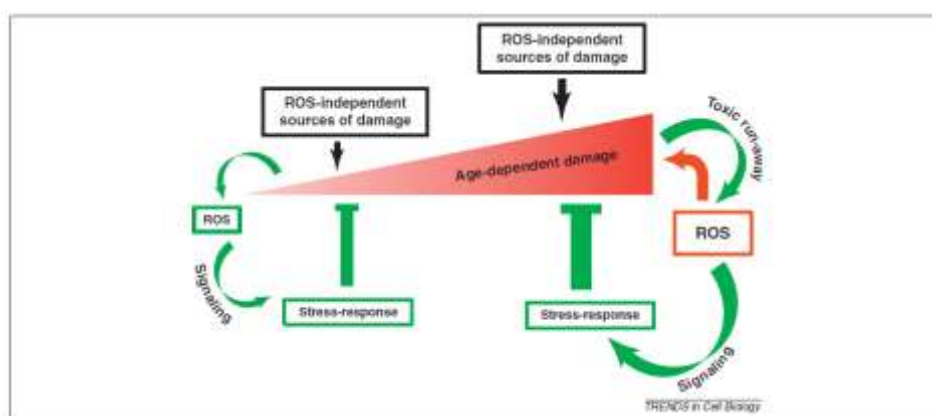


Figure 108 - Hypothèse de la réponse graduelle aux ROS (Hekimi, 2011)

Le vieillissement étant très sensible aux facteurs de stress liée à des déficiences de plusieurs **systèmes physiologiques interdépendants**, au déclin des mécanismes de résilience, à la perte de l'équilibre homéostatique et aux altérations fonctionnelles qui caractérisent le vieillissement, il est donc nécessaire **de lutter contre la fragilité des systèmes biologiques vieillissants en ciblant la fenêtre biologique de la normalité**.

Sans nul doute, l'importance de **l'interconnexion des mécanismes dans le vieillissement**, soulignée par des données de plus en plus nombreuses - comme récemment l'existence d'un lien entre l'horloge circadienne et les senseurs de nutriments (mTOR, Sirt1...) (Orozco-Solis et Sassone-Corsi, 2014) - renforce l'intérêt de moduler la durée de vie en jouant sur un ensemble de facteurs. La combinaison de progrès multiples sur les cellules souches et sur les mécanismes physiologiques du vieillissement laisse espérer des progrès supplémentaires dans l'allongement de l'espérance de vie des êtres humains, même s'il paraît aujourd'hui utopique de cibler tous les marqueurs du vieillissement. Les avancées sur la reprogrammation des cellules souches âgées en cellules embryonnaires retrouvant des caractéristiques phénotypiques de cellules jeunes vont permettre de réparer, voire de guérir, certains organes ou tissus endommagés, contribuant ainsi à l'allongement de la durée de vie. Sans répondre à notre quête d'immortalité, si toutefois l'on considère qu'elle est un avantage pour la civilisation, ces avancées aideront les personnes âgées à vieillir beaucoup mieux. Dans ce contexte, la recherche cosmétique sur le vieillissement de la peau et du cheveu revêt une double importance. Ces tissus, de par leur accessibilité et les méthodes *in vitro* aujourd'hui disponibles, représentent des modèles de choix pour l'étude du vieillissement chez l'homme. Par ailleurs, ces organes constituent des éléments majeurs de l'apparence et, à ce titre, constituent de puissants outils de socialisation en favorisant la communication, en maintenant le lien ou en repoussant les limites de l'isolement au fur et à mesure que l'homme vieillit.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adair-Kirk, T.L., Senior, R.M. (2008) Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 40(6-7):1101-10.
- Adler, A.S., Sinha, S., Kawahara, T.L. et al. (2007) Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev* 21(24):3244-57.
- Agrelo, R., Cheng, W.H., Setien, F., et al. (2006) Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 103(23):8822-7.
- Agrelo, R., Setien, F., Espada, J., et al. (2005) Inactivation of the lamin A/C gene by CpG island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 23(17):3940-7.
- Ahlqvist, K.J., Härmäläinen, R.H., Yatsuga, S., et al. (2012) Somatic progenitor cell vulnerability to mitochondrial DNA mutagenesis underlies progeroid phenotypes in Polg mutator mice. *Cell Metab* 15(1):100-9.
- Ahmed, E.K., Picot, C.R., Bulteau, A.L. et al. Protein oxidative modifications and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. (2007) *Ann N Y Acad Sci* 1119:88-96. Review.
- Aitken, G. R., Henderson, J. R., Chang, S. C., et al. (2007) Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Clin. Exp. Dermatol* 32 :722–727.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., et al. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 89(21): 10114-10118.
- Andziak, B., O'Connor, T.P., Buffenstein R. (2005) Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Mech Ageing Dev* 126(11):1206–1212.
- Andziak B., O'Connor, T.P., Qi, W. et al. (2006) High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* 5(6):463-471.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Egormin, P.A., et al. (2008) Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle* 7(17):2769-73.
- Anselmi, C.V., Malovini, A., Roncarati, R., et al. (2009) Association of the FOXO3A locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study. *Rejuvenation Res* 12(2):95-104.
- Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., et al. (2004) The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev* 18(24):3004-9.
- Armanios, M., Alder, J.K., Parry, E.M., et al. (2009) Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet* 85(6):823-32.

- Aubert, G., Lansdorp, P.M. (2008) Telomeres and aging. *Physiol Rev* 88(2):557-79. Review.
- Aumailley, M., Rousselle, P. (1999) Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biology* 18:19-28.
- Bahar, R., Hartmann, C.H., Rodriguez, K.A., et al. (2006) Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* 441(7096):1011-4.
- Baker D.J., Weaver, R.L., van Deursen J.M. (2013) p21 both attenuates and drives senescence and aging in BubR1 progeroid mice. *Cell Rep* 3(4):1164-74.
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T. et al. (2011) Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479(7372):232-6.
- Bandyopadhyay, D., Medrano, E.E. (2000) Melanin accumulation accelerates melanocyte senescence by a mechanism involving p16INK4a/CDK4/pRB and E2F1. *Ann N Y Acad Sci* 908:71-84.
- Baraibar, M.A., Friguet, B. (2012) Changes of the proteasomal system during the aging process. *Prog Mol Biol Transl Sci* 109:249-75. Review.
- Baraibar, M.A., Friguet, B. (2013) Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Exp Gerontol* 48(7):620-5.
- Baranek, T., Debret, R., Antonicelli, F., et al. (2007) Elastin receptor (spliced galactosidase) occupancy by elastin peptides counteracts proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes through NF-kappaB down-regulation. *J Immunol* 179(9):6184-92.
- Batisse, D., Bazin, R., Baldeweck, T. et al. (2002) Influence of age on the wrinkling capacities of skin. *Skin Res Technol* 8:148-54.
- Batlevi, Y., La Spada, A.R. (2011) Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. *Neurobiol Dis* 43(1):46-51. Review.
- Baulieu, E.E., Thomas, G., Legrain, S. et al. (2000) Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad* 97(8):4279-84.
- Baumann, L. (2007) Skin ageing and its treatment. *J Pathol* 211(2):241-51. Review.
- Baur, J.A., Chen, D., Chini, E.N., et al. (2010) Dietary restriction: standing up for sirtuins. *Science* 329(5995):1012-3.
- Bellizzi, D., Rose, G., Cavalcante, P., et al. (2005) A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics* 85(2):258-63.

Benz, G., Hölzel, D., Schmoeckel, C. (1991) Inflammatory cellular infiltrates in melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 13(6):538-42.

Berdichevsky, A., Viswanathan, M., Horvitz, H.R., et al. (2006). *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* 125(6):1165-77.

Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhata, R., et al. (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23(7):781-3.

Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272(33):20313-6. Review.

Bernard, B.A. (2006) The life of human hair follicle revealed. *Med Sci* 22(2):138-43. Review.

Bernard, B.A. (2012) The human hair follicle, a bistable organ? *Exp Dermatol* 21(6):401-3. Review.

Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K. et al. (2012) Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 4(8):691-704.

Berneburg, M., Kamenisch, Y., Krutmann, J., et al. (2006). To repair or not to repair - no longer a question: repair of mitochondrial DNA shielding against age and cancer. *Exp Dermatol* 15(12):1005-15.

Berneburg, M., Gattermann, N., Stege, H., et al. (1997) Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system *Photochem Photobiol* 66(2):271-5.

Bernstein, E.F., Underhill, C.B., Hahn, P.J. et al. (1996) Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br J Dermatol* 135(2):255-62.

Biagi, E., Candela, M., Turrone, S., et al. (2013) Ageing and gut microbes: perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacol Res* 69(1):11-20. Review.

Birch, M.P., Messenger, J.F., Messenger, A.G. (2001) Hair density, hair diameter and the prevalence of female pattern hair loss. *Br J Dermatol* 144(2):297-304.

Birch-Machin, M.A., Swallow, H. (2010) How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis* 25(2):101-107.

Birch-Machin, M.A., Tindall, M., Turner, R., et al. (1998) Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo-rather than chronological aging. *J Invest Dermatol* 110(2):149-52.

Biroccio, A., Cherfils-Vicini, J., Augereau, A., et al. (2013) TRF2 inhibits a cell-extrinsic pathway through which natural killer cells eliminate cancer cells. *Nat Cell Biol* 15(7):818-28.

Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., et al. (2010) Mechanisms of life span extension by Rapamycin in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Cell Metab. 11(1): 35-46.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., et al. (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. JAMA 297 (8):842-857.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, C. (2013) Antioxidant supplements to prevent mortality. JAMA 310(11):1178-9.

Blagosklonny, M.V. (2009) Validation of anti-aging drugs by treating age-related diseases. Aging 1(3):281-8. Review.

Blagosklonny, M.V. (2011) Hormesis does not make sense except in the light of TOR-driven aging. Aging 3(11):1051-62.

Blasco, M.A. (2007) The epigenetic regulation of mammalian telomeres. Nat Rev Genet 8(4):299-309. Review.

Bläuer, M., Vaalasti, A., Pauli, S.L., et al. (1991) Location of androgen receptor in human skin. J Invest Dermatol 97(2):264-8.

Bluher, M., Kahn, B.B., Kahn, C.R. (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. Science 299 (5606):572 -574.

Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M.E., et al. (2011) Epigenetic predictor of age. PLoS One 6(6):e14821.

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., et al. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science 279(5349):349-52.

Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., et al. (2009) Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. Mech Ageing Dev 130(4):234-9.

Boonekamp, J.J., Simons, M.J., Hemerik, L., et al. (2013) Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. Aging Cell 12(2):330-2.

Bosset, S., Bonnet-Duquenois, M., Barré, P., et al. (2003) Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. Br J Dermatol. 2003 149(4):826-35.

Boukamp, P. (2005) Skin aging: a role for telomerase and telomere dynamics? Curr Mol Med. 5(2):171-7.

Boulas, K., Horvitz, H.R. (2012) The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO. Cell Metab 15(4):439-50.

Bourguignon, L.Y., Singleton, P.A., Diedrich, F. (2004) Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1-dependent protein kinase N-gamma promotes phospholipidase Cgamma1 activation, Ca²⁺ signaling, and cortactin cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation. *J Biol Chem* 279(28):29654-69.

Boutten, A., Goven, D., Artaud-Macari, E., et al. (2011) NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol Med* 17(7):363-71. Review.

Bratic, A., Larsson, N.G. (2013) The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123(3):951-7. Review.

Brincat, M., Kabalan, S., Studd, J.W., et al. (1987) A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal woman. *Obstet Gynecol*. 70(6):840-5.

Brondello, J.M., Prieur, A., Philipot, D., et al. (2012) Cellular senescence and the myth of Janus. *Med Sci* 28(3):288-96. Review.

Brown-Borg, H.M., Johnson, W.T., Rakoczy, S.G. (2011) Expression of oxidative phosphorylation components in mitochondria of long-living Ames dwarf mice. *Age* 34:43-57.

Brown, K., Xie, S., Qiu, X., et al. (2013) SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Rep* 3(2):319-27.

Buckingham, E.M., Klingelutz, A.J. (2011) The role of telomeres in the ageing of human skin. *Exp Dermatol* 297-302. Review.

Bulteau, A.L., Moreau, M., Nizard, C., et al. (2007) Proteasome and photoaging: the effects of UV irradiation. *Ann N Y Acad Sci* 1100:280-90.

Burnett, C., Valentini, S., Cabreiro, F., et al. (2011) Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 477(7365):482-5.

Burtner, C.R., Kennedy, B.K. (2010) Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(8):567-78.

Calabrese, E.J., Mattson, M.P., Calabrese, V. (2010) Dose response biology: the case of resveratrol. *Hum Exp Toxicol* 29(12):1034-7.

Callens, A., Vaillant, L., Lecomte, P. et al. (1996) Does hormonal skin aging exist? A study of the influence of different hormone therapy regimens on the skin of postmenopausal women using non-invasive measurement techniques. *Dermatology* 193(4):289-94.

Calvo E., Luu-The, V., J. Morisset, J., et al. (2008) Pangenomic changes induced by DHEA in the skin of postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 112:186-193.

Camacho-Vanegas, O., Bertini, E., Zhang, R.Z., et al. (2001) Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci* 98(13):7516-21.

Campisi J. (1996). Replicative senescence: an old live's tale? *Cell* 84:497-500.

Campisi, J. (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120(4):513-22. Review.

Capeau, J. (2003) Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance *Med Sci* 19(8-9):834-9. Review.

Carlson, M.E., Suetta, C., Conboy, M.J., et al. (2009) Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Mol Med* 1(8-9):381-91.

Carrino, D.A., Calabro, A., Darr, A.B., et al. (2011) Age-related differences in human skin proteoglycans. *Glycobiology* 21(2):257-68.

Casillas, M.A. Jr, Lopatina, N., Andrews, L.G., et al. (2003) Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 252(1-2):33-43.

Castelo-Branco, C., Pons, F., Gratacos, E., et al. Relationship between skin collagen and bone changes during aging. (1994) *Maturitas* 18: 199-206.

Castelo-Branco, C., Soveral, I. (2014) The immune system and aging: a review. *Gynecol Endocrinol* 30(1):16-22. Review.

Catalgol, B., Ziaja, I., Breusing, N. et al. (2009) The proteasome is an integral part of solar ultraviolet a radiation-induced gene expression. *J Biol Chem* 284(44):30076-86.

Challen, G.A., Boles, N.C., Chambers, S.M., et al. (2010) Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* 6(3):265-78.

Chan, S.R., Blackburn, E.H. (2004) Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1441):109-21. Review.

Chen, Y.Q., Mauviel, A., Ryyanen, J., et al. (1994) Type VII collagen gene expression by human skin fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of donor age and cytokine responses. *J Invest Dermatol* 102 (2):205-9.

Chen, W.Y., Wang, D.H., Yen, R.C., et al. (2005). Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123(3):437-48.

Chiang, W.C., Ching, T.T., Lee, H.C., et al. (2012) HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity. *Cell* 2012 148(1-2):322-34.

Chicas, A., Wang, X., Zhang C, et al. (2010) Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell* 17(4):376-87.

Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., et al. (2014) Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* (11):1139-53. Review.

Choi, J.S., Choi, K.M., Lee, C.K. (2011) Caloric restriction improves efficiency and capacity of the mitochondria electron transport chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 409(2):308–314.

Chondrogianni, N., Gonos, E.S. (2005) Proteasome dysfunction in mammalian aging: steps and factors involved. *Exp Gerontol* 40(12):931-8. Review.

Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Franceschi, C., et al. (2000) Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp Gerontol* 35(6-7):721-8.

Chondrogianni, N., Stratford, F.L., Trougakos, I.P., et al. (2003) Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem* 278(30):28026-37.

Christensen, B.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., et al. (2009) Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet* 5(8):e1000602.

Coleman, S.R., Grover, R. (2006) The anatomy of the aging face: volume loss and changes in 3-dimensional topography. *Aesthet Surg J* 26(1S):S4-9.

Collins, K., Mitchell, J.R. (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21(4):564-79. Review.

Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., et al (2009) Dietary restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325, 201-204.

Commo, S., Gaillard, O., Bernard, B.A. (2004) Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath. *Br J Dermatol* 150(3):435-43.

Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., et al. (2005) Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433(7027):760-4.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., et al. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J* 10:1195-1214.

Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M.T., et al. (1992) Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* 2(4) 324-9.

Corstjens, H., Dicanio, D., Muizzuddin, N., et al. (2008) Glycation associated skin autofluorescence and skin elasticity are related to chronological age and body mass index of healthy subjects. *Exp Gerontol* 43(7):663-7.

Cosgrove, B.D., Gilbert, P.M., Porpiglia, E., et al. (2014) Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat Med* 20(3):255-64.

Courtois, M., Loussouarn, G., Hourseau, C., et al. (1994) Hair cycle and alopecia. *Skin Pharmacol* 7(1-2):84-9.

Courtois, M., Loussouarn, G., Hourseau, C., et al. (1995) Ageing and hair cycles. *Br J Dermatol* 132(1):86-93.

Csiszar, A., Ungvari, Z., Koller, A., et al. (2003) Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. *FASEB J.* 17(9):1183-5.

Cuanalo-Contreras, K., Mukherjee, A., Soto, C. (2013) Role of protein misfolding and proteostasis deficiency in protein misfolding diseases and aging. *Int J Cell Biol* 2013:1-10.

d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., et al. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426 (6963):194-198.

d'Adda di Fagagna, F. (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA damage response. *Nat Rev Cancer* 8:512-522. Review.

Dagda, R.K., Cherra, S.J. 3rd, Kulich, S.M., et al. (2009). Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem* 284(20):13843-55.

Dai, Y., Faller, D.V. (2008) Transcription Regulation by Class III Histone Deacetylases (HDACs)-Sirtuins. *Transl Oncogenomics* 3:53-65. Review.

Dai, D.F., Rabinovitch, P.S., Ungvari, Z. (2012) Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res* 110(8):1109-1124.

Dang, W., Steffen, K.K., Perry, R., et al. (2009) Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* 459(7248):802-7.

David, D.C., Ollikainen, N., Trinidad, J.C., et al. (2010) Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol* 8(8):e1000450.

Debacq-Chainiaux, F., Boilan, E., Dedessus Le Moutier, J. et al. (2010) p38(MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. *Adv Exp Med Biol* 694:126-37. Review.

Debret, R., Antonicelli, F., Theill, A., et al. (2005) Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(7):1353-8.

de Lacharrière, O., Deloche, C., Misciali, B.M. et al. (2001) Hair diameter diversity: a clinical sign reflecting the follicle miniaturization. *Arch Dermatol* 137: 641-646.

Deloche, C., Bastien, P., Chadoutaud, S. et al. (2007) Low iron stores: a risk factor for excessive hair loss in non-menopausal women. *Eur J Dermatol* 17 (6):1-6.

Deloche, C., de Lacharrière O., Misciali C et al. (2004) Histological features of peripilar signs associated with androgenetic alopecia. *Arch Dermatol Res* 295: 422-428.

Deloche, C., El-Alfy M., Azzi, L. et al. (2010) Skin responses to topical dehydroepiandrosterone: implications in antiageing treatment? *Br J Dermatol* 163:968-976.

Deloche, C., Minondo, A.M., Bernard, B.A., et al. (2011) Effect of C-xyloside on morphogenesis of the dermal epidermal junction in aged female skin. An ultrastructural pilot study. *Eur J Dermatol* 21(2):191-196.

Demontis, F., Perrimon, N. (2009) Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in *Drosophila*. *Development* 136(6):983-93.

Demuro, A., Mina, E., Kayed, R., et al. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280(17):17294-300.

de Rigal, J., Abella, M.L., Giron, F. et al. (2007) Development and validation of a new Skin Color Chart. *Skin Res Technol* 13(1):101-9.

de Rigal, J., Escoffier, C., Querleux, B., et al. (1989) Assessment of aging of the human skin by in vivo ultrasonic imaging. *J Invest Dermatol* 93(5):621-5.

D'Errico, M., Lemma, T., Calcagnile, A, et al. (2007) Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutat Res* 614(1-2):37-47. Review.

de Rivero Vaccari, J.P., Sawaya, M.E., Brand, F. 3rd, et al. (2012) Caspase-1 level is higher in the scalp in androgenetic alopecia. *Dermatol Surg* 38(7 Pt 1):1033-9.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 92(20): 9363–9367.

Ding, D., Xi, P., Zhou, J., et al. (2013) Human telomerase reverse transcriptase regulates MMP expression independently of telomerase activity via NF- κ B-dependent transcription. *FASEB J* 27(11):4375-83.

Doles, J., Storer, M., Cozzuto, L., et al. (2012) Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function. *Genes Dev* 26(19):2144-53.

Downing, D.T., Stewart, M.E., Strauss, J. (1988) Changes in sebum secretion and sebaceous glands during aging. In Cutaneous aging Ed. A.M. Kligman and Y. Takase, University of Tokyo Press.

Druzhyna, N.M., Wilson, G.L., LeDoux, S.P. (2008) Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev* 129(7-8):383-90. Review.

Dumont, M., Luu-The, V., Dupont, E. et al. (1992) Characterization, expression and immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase in human skin. *J Invest Dermatol* 99:415-21.

Dunn, L.B., Damesyn, M., Moore, A.A. et al. (1997). Does estrogen prevent skin aging? *Arch Dermatol* 133: 339-342.

Edgar, D., Shabalina, I., Camara, Y., et al. (2009) Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab* 10(2):131-8.

Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., et al. (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11(11):1305-14.

Elias, P.M., Ghadially, R. (2002). The aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities. *Clin Geriatr Med* 18(1):103-20.

El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., et al. (2002) Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* 11(5):398-405.

Epel, E.S., Blackburn, E.H., Lin, J., et al. (2004) Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci* 101(49):17312-5.

Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., et al (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423(6937):293-8.

Erol, A. (2011) Deciphering the intricate regulatory mechanisms for the cellular choice between cell repair, apoptosis or senescence in response to damaging signals. *Cell Signal* (7):1076-81. Review.

Escoffier, C., de Rigal, J., Rochefort, A., et al. (1988) Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J Invest Dermatol* 93(3):353-7.

Faggioli, F., Vijg, J., Montagna, C. (2011). Chromosomal aneuploidy in the aging brain. *Mech Ageing Dev* 132(8-9):429-36.

Farout, L., Friguet, B. (2006) Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxid Redox Signal* 8(1-2):205-16. Review.

- Fernandez-Capetillo, O. (2010) Intrauterine programming of ageing. *EMBO Rep* 11:32-36.
- Feser, J., Tyler, J. (2011) Chromatin structure as a mediator of aging. *FEBS Lett* 585(13):2041-8. Review.
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., et al. (1989) Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 245 (4919):752-5.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408(6809):239-47. Review.
- Fisher, G.J., Varani, J., bata-Csorgo, Z. et al. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 138:1462-1470.
- Fisher, G.J., Varani, J., Voorhees, J.J. (2008) Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol* 144:666–672.
- Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Datta, S.C. et al. (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337(20):1419-28.
- Flachsbart, F., Caliebe, A., Kleindorp, R., et al. (2009) Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci* 106(8):2700-5.
- Flament, F., Bazin, R., Laquieze, S., et al. (2013) Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasian skin. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 6:221-32.
- Florian, M.C., Dörr, K., Niebel, A., et al. (2012) Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell* 10(5):520-30.
- Fontana, L., Partridge, L., Longo, V.D. (2010) Extending healthy life span from yeast to humans. *Science* 328(5976):321-6.
- Fraga, M.F., Agrelo, R., Esteller, M. (2007) Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. *Ann N Y Acad Sci*. 1100:60-74. Review. (b)
- Fraga, M.F., Esteller, M. (2005) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 23(8):413-8.
- Fraga, M.F., Esteller, M. (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 23(8):413-8. (a)
- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., et al. (2007) Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 128(1):92-105. Review.
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., et al. (2010) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Exp Gerontol*. 35(6-7):879-96. Review.

Francis, N., Gregg, T., Owen, R., et al. (2006) Lack of age-associated telomere shortening in long-and short-lived species of sea urchins. *FEBS Lett* 580(19):4713-7.

Freund, A., Patil, C.K., Campisi, J. (2011) p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 30(8):1536-48.

Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., et al. (2004) Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 68(Pt 3):196-204.

Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M. et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* 14(5):555.

Galan, P., Yoon, H.C., Preziosi, P., et al. (1998) Determining factors in the iron status of adult women in the Suvimax women. *Eur J Clin Nutr* 52:383-8.

García-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H., et al. (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* 36(1):94-9.

Garcia, A.M., Calder, R.B., Dollé, M.E., et al. (2010) Age-and temperature-dependent somatic mutation accumulation in *Drosophila melanogaster* *PLoS Genet* 6(5):e1000950.

Garinis, G.A., Van der Horst, G.T., Vijg, J., et al. (2008) DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* 10(11):1241-7. Review.

Garmyn, M, Yarosh DB. (2006) The molecular and genetic effects of ultraviolet radiation exposure on skin cells. In: *Photodermatology: LimHW, Honigsman H, Hawk JLM, eds. New York: Informa Healthcare* p.41-50.

Gehrig, S.M., van der Poel, C., Sayer, T.A. et al. (2012). Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* 484(7394):394-8.

Gems, D., Patridge, L. (2013). Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Ann Rev. Physiol* 75, 621-644.

Giangreco, A., Qin, M., Pinter, J.E., et al. (2008) Epidermal stem cells are retained *in vivo* throughout skin aging. *Aging Cell* 7(2):250-9.

Gilchrist, B.A., Stoff, J.S., Soter, N.A. (1982) Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. *J Invest Dermatol* 79(2):85-8.

Gilson E, Londoño-Vallejo A. (2007) Telomere length profiles in humans: all ends are not equal. *Cell Cycle* 6(20):2486-94. Review.

Giralt, A., Villarroya, F. (2012) SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J* 444:1–10.

Gire, V. (2005) Senescence: a telomeric limit to immortality or a cellular response to physiologic stresses? *Med Sci* 21(5):491-7. Review.

Giunta, S. (2008) Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): anti-inflamm-aging remodelling of inflamm-aging, from robustness to frailty. *Inflamm Res* 57(12):558-63.

Gniadecka, M., Jemec, G.B. (1998) Quantitative evaluation of chronological ageing and photoageing in vivo: studies on skin echogenicity and thickness. *Br J Dermatol* 139(5):815-21.

Gniadecka, M., Nielsen, O.F., Wessel, S., et al. (1998) Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *J Invest Dermatol* 111(6):1129-33.

Gornik, O., Pavic, T, Lauc, G. (2012) Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 1820(9):1318-26.

Green, DR., Galluzzi, L., Kroemer, G. (2011) Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333(6046):1109-12. Review.

Green, D.R., Galluzzi, L., Kroemer, G. (2014) Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* 345(6203):1250256. Review.

Green, D.R., Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684):626-629. Review.

Greer, E.L., Shi, Y. (2014) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13(5):343-57.

Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43(2 Pt 1):405-13.

Griffiths, C.E. (1992) The clinical identification and quantification of photodamage. *Br J Dermatol* 127(S41):37-42.

Gronniger, E., Weber, B., Heil, O., et al. (2010) Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet* 6(5):e1000971.

Grove, G.L., Cristofalo, V.J. (1977) Characterization of the cell cycle of cultured human diploid cells: effects of aging and hydrocortisone. *J Cell Physiol* 90(3):415-22.

Gruber, R., Koch, H., Doll, B.A., et al. (2006) Fracture healing in the elderly patient. *Exp Gerontol* 41(11):1080-93. Review

Guarente, L. (2011) Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76:81-90.

Guerrettaz, L.M., Johnson, S.A., Cambier, J.C. (2008) Acquired hematopoietic stem cell defects determine B-cell repertoire changes associated with aging. *Proc Natl Acad Sci* 105(33):11898-902.

Gutsmann-Conrad, A., Heydari, A., R., You, S., et al. (1998). The expression of heat shock protein 70 decreases with cellular senescence in vitro and in cells derived from young and old human subjects. *Exp Cell Res* 241(2):404-13.

Hackett, J.A., Greider, C.W. (2002) Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 21(4):619-26. Review.

Haithcock, E., Dayani, Y., Neufeld, E., et al. (2005) Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci* 102(46):16690-5.

Hallows, W.C., Lee, S., Denu, J.M. (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *PNAS* 103(27):10230-10235.

Hamilton, J.B. (1951) Patterned loss of hair in man; types and incidence. *Ann N Y Acad Sci* 53(3):708-28.

Han, Y., Han, D., Yan, Z., et al. (2012) Stress-associated H3K4 methylation accumulates during postnatal development and aging of rhesus macaque brain. *Aging Cell* 11(6):1055-64.

Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., et al. (2007) Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6(1):95-110.

Hanson, K.M., Simon, J.D. (1998) Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. *Proc Natl Acad Sci* 95: 10576-8.

Hardie, D.G. (2014) AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 33C:1-7. Review.

Härle-Bachor, C., Boukamp, P. (1996) Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci* 93(13): 6476-6481.

Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345(6274):458-60.

Harman, D. (1965) The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels. *J Gerontol* 20:151–153.

Harman, D. (1992) Free radical theory of aging. *Mutat. Res* 275: 257-266.

Harries, L.W., Hernandez, D., Henley, W., et al. (2011) Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging Cell* 10(5):868-78.

Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., et al. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460(7253):392-5.

Hashizume, H. (2004) Skin aging and dry skin. *J Dermatol* 31: 603-9.

Hattiangady, B., Shetty, A.K. (2008) Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus. *Neurobiol Aging* 29(1):129-47.

Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.

Hebert, S.L., Lanza, I.R., Nair, K.S. (2010) Mitochondrial DNA alterations and reduced mitochondrial function in aging. *Mech Ageing Dev* 131(7-8):451-62. Review.

Hekimi, S., Lapointe, J., Wen, Y. (2011) Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* 21:569–576.

Hennekam, R.C.M (2006) Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* 140(23):2603-24. Review.

Henry, F., Pierard-Franchimont, C., Cauwenbergh, G., et al. (1997) Age-related changes in facial skin contours and rheology. *J Am Geriatr Soc* 45: 220-222.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., et al. (2004) Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 14(4):501-13.

Herranz, D., Muñoz-Martin, M., Cañamero, M., et al. (2010) Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* 1(3):1-17.

Herrera, E., Samper, E., Martín-Caballero, J., et al. (1999) Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J* 18(11):2950-60.

Hirschey, M.D., Shimazu, T., Goetzman, E., et al. (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme désacétylation. *Nature* 464 (7285):121-5.

Hoeijmakers, J.H. (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361(15):1475-85. Review.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421(6919):182-7.

Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14(10):R115.

Huang, X., Yang, N., Fiore, V.F. et al. (2012) Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47:340-8.

Huber, N., Sakai, N., Eismann, T., et al. (2009) Age-related decrease in proteasome expression contributes to defective nuclear factor-kappaB activation during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 49(5):1718-28.

Hudson, D.L., Sleeman, J., Watt, F.M. (1995) CD44 is the major peanut lectin-binding glycoprotein of human epidermal keratinocytes and plays a role in intercellular adhesion. *J Cell Sci* 108:1959-1970.

Hwang, J.W., Yao, H., Caito, S., et al. (2013) Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic Biol Med* 61C:95-110.

Jaisson, S., Gillery, P. (2010) Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin Chem* 56(9):1401-12.

Janson, D., Saintigny, G., Mahé, C., et al. (2013) Papillary fibroblasts differentiate into reticular fibroblasts after prolonged in vitro culture. *Exp Dermatol* 22(1):48-53.

Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H.E. et al. (2006) Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 443(7110):421-6.

Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.H., et al. (2011) Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469(7328):102-6.

Jaworsky, C., Kligman, A.M., Murphy, G.F. (1992) Characterization of inflammatory infiltrates in male pattern alopecia: implications for pathogenesis. *Br J Dermatol* 127 (3):239-46.

Jeck, W.R., Siebold, AP, Sharpless, N.E. (2012) Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging Cell* 11(5):727-31. Review.

Jensen, J.M., Förl, M., Winoto-Morbach, S., et al. (2005) Acid and neutral sphingomyelinase, ceramide synthase, and acid ceramidase activities in cutaneous aging. *Exp Dermatol* 14(8):609-18.

Johnson, S.M., Connelly, S., Fearn, C., et al. (2012) The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *J Mol Biol* 421(2-3):185-203.

Jou, M. J., Jou, S. B., Guo, M. J. et al. (2004) Mitochondrial reactive oxygen species generation and calcium increase induced by visible light in astrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 45–56.

Kaeberlein, M., Powers, R.W. (2007) Sir2 and calorie restriction in yeast: a skeptical perspective. *Ageing Res Rev* 6(2):128-40. Review.

Kaeberlein, M., Powers, R.W. 3rd, Steffen, K.K., et al. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310(5751):1193-6.

Kanfi, Y., Naiman, S., Amir, G., et al. (2012) The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* 483(7388):218-21.

Kapahi, P., Chen, D., Rogers, A.N., et al. (2010) With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab* 11(6):453-65.

Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., et al. (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* 14(10):885-90.

Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K. et al. (2013) A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* 498(7452):109-12.

Kawahara, T.L., Michishita, E., Adler, A.S. et al. (2009) SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* 136(1):62-74.

Kaya, G., Tran, C., Sorg, O., et al. (2006) Hyaluronate fragments reverse skin atrophy by a CD44-dependent mechanism *PLoS Med* 3(12):e493.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., et al. (1993) A *C elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366:461-464.

Kenyon, C. (2005) The plasticity of aging insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449-460. Review.

Kenyon, C.J. (2010) The genetics of ageing. *Nature* 464(7288):504-512. Review.

Khaidakov, M., Heflich, R.H., Manjanatha, M.G., et al. (2003) Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice. *Mutat Res* 526(1-2):1-7.

Kikis, E.A., Gidalevitz, T., Morimoto, R.I. (2010) Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Adv Exp Med Biol* 694:138-59. Review.

Kim, S.N., Lee, S.Y., Choi, M.H., et al. (2013) Characteristic features of ageing in Korean women's hair and scalp. *Br J Dermatol* 168(6):1215-23.

King, A., Gottlieb, E., Brooks, D. G., et al. (2004). Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate if blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 79: 470–475.

- Kippin, T.E., Martens, D.J., van der Kooy, D. (2005) p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev* 19(6):756-67.
- Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S., et al. (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem*. 279(37):39068-74.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N. et al. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Nature* 392(6676):605-8.
- Klapper, W., Kühne, K., Singh, K.K., et al. (1998) Longevity of lobsters is linked to ubiquitous telomerase expression. *FEBS Lett* 439 (1-2):143-6.
- Kleemann, R., Bucala, R. (2010) Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities. *Mediators Inflamm* 2010:610479. Review.
- Knott, A.B., Bossy-Wetzel, E. (2008) Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147:283-92.
- Kobayashi, Y., Iwai, I., Akutsu, N., et al. (2008) Increased carbonyl protein levels in the stratum corneum of the face during winter. *Int J Cosmet Sci* 30(1):35-40.
- Koch, H., Wittern, K.P., Bergemann, J.(2001) In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. *J Invest Dermatol* 117(4):892-7.
- Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M., et al. (2011) Skin ageing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25(8):873-84. Review.
- Kojima, T., Kamei, H., Aizu, T., et al. (2004) Association analysis between longevity in the Japanese population and polymorphic variants of genes involved in insulin and insulin-like growth factor 1 signaling pathways. *Exp Gerontol* 39(11-12):1595-8.
- Korkmaz, A., Manchester, L.C., Topal, T. et al. (2011) Epigenetic mechanisms in human physiology and diseases. *J Exp Integr Med* 1(3): 139-147.
- Krasnovsky, A. A., Drozdova, N. N., Ivanov A. V., et al. (2003) Activation of molecular oxygen by infrared laser radiation in pigment-free aerobic systems. *Biochemistry* 68: 963–966.
- Kristic, J., Vuckovic, F., Menni, C., et al. (2014) Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69(7):779-89.
- Kronic, D., Moshir, S., Greulich-Bode, K.M., et al. (2009) Tissue context-activated telomerase in human epidermis correlates with little age-dependent telomere loss. *Biochim Biophys Acta* 1792(4):297-308.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., et al. (2010) The essence of senescence. *Genes Dev* 24(22):2463-79. Review.

Kujoth, G.C., Bradshaw, P.C., Haroon, S., et al. (2007) The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genet* 3(2):e24. Review.

Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D. et al. (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309 (5733):481-484.

Labrie, F., Bélanger, A., Bélanger, P; et al. (2006) Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 99(4-5):182-8.

Labrie, F., Bélanger, A., Bélanger, P; et al. (2007) Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 103(2):178-88.

Labrie, F., Bélanger, A., Cusan, L. et al. (1997). Decline in Serum Concentrations of Adrenal C19 Sex Steroid Precursors and Conjugated Androgen Metabolites During Aging. *J Clin Endocrinol Metab* 82(8):2396-402.

Labrie, F., Luu-The, V., Bélanger, A., et al. (2005) Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol* 187(2):169-96. Review.

Lagouge, M., Larsson, N.G. (2013) The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J Intern Med* 273(6):529-43. Review.

Lambert, A.J., Boysen, H.M., Buckingham, J.A, et al. (2007) Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell* 6(5):607-618.

Langton, A.K., Sherratt, M.J., Griffiths CE, et al. (2010) A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing. *Int J Cosmet Sci* 32(5):330-339.

Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., et al.(2011) Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev* 25(21):2248-53.

Laplane, M., Sabatini, D.M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2):274-93.

Larson, K., Yan, S.J., Tsurumi, A., et al. (2012) Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS Genet* 8(1):e1002473.

Larsson, N.G. (2010) Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem* 79:683-706.

Lauc, G., Vojta, A., Zoldoš, V. (2014) Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochim Biophys Acta* 1840(1):65-70.

- Lavasani, M., Robinson, A.R., Lu, A., et al. (2012) Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun* 3:608.
- Lavker, R.M. (1979) Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 73: 59-66.
- Lavker, R.M. (1995) Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. *Photoaging* Edited by BA Gilchrest. Cambridge, MA, Blackwell Science, 123-135.
- Lavker, R.M., Zheng, P., Dong, G. (1987) Aged skin: a study by light transmission electron and scanning electron microscopy. *J Invest Dermatol* 88:44-51.
- Lee, B., Y., Han, J., A., Im, J., S., et al. (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5(2):187-95.
- Lee, B.H., Lee, M.J., Park, S., et al. (2010) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 467(7312):179-84.
- Lefebvre, J.S., Maue, A.C., Eaton, S.M., et al. (2012) The aged microenvironment contributes to the age-related functional defects of CD4 T cells in mice. *Aging Cell* 11(5):732-40.
- Lejnine, S., Makarov, V.L., Langmore, J.P. (1995) Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 92(6):2393-7.
- Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132(1):27-42.
- Levine, R.L., Stadtman, E.R. (2001) Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 36(9):1495-502. Review.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., et al. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* 6 (19):1-19.
- Li, Y., Wang, W.J., Cao, H., et al. (2009) Genetic association of FOXO1A and FOXO3A with longevity trait in Han Chinese populations. *Hum Mol Genet* 18(24):4897-904.
- Lightowers, R.N., Jacobs, H.T., Kajander, O.A. (1999) Mitochondrial DNA-all things bad? *Trends Genet* 15(3):91-3.
- Lipinski, M.M., Zheng, B., Lu, T., et al. (2010) Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 107(32):14164-9.
- Liu, B., Larsson, L., Caballero, A., et al. (2010) The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. *Cell* 140(2):257-67.

Liu, G., Rogers, J., Murphy, C.T., et al. (2011) EGF signalling activates the ubiquitin proteasome system to modulate *C. elegans* lifespan. EMBO J 30(15):2990-3003.

Liu, G.H, Suzuki, K., Qu, J., et al. (2011) Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. Cell Stem Cell 8(6):688-94.

Ljungquist, B., Berg, S., Lanke, J., et al. (1998) The effect of genetic factors for longevity: a comparison of identical and fraternal twins in the Swedish Twin Registry. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 53(6):M441-6.

Lopez-Otin C., Blasco M., A., Partridge, L., et al. (2013) The hallmarks of aging. Cell 153(6):1194-217.

Loussouarn, G., El Rawadi, C., Genain, G.(2005) Diversity of hair growth profiles. Int J Dermatol 44 Suppl 1:6-9.

Lowe, S.W., Seper, E., Evan, G. (2004) Intrinsic tumour suppression. Nature 432(7015):307-315. Review.

Ludwig, E. (1977) Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. Br J Dermatol 97(3):247-54.

Lundblad, V. (2002) Telomere maintenance without telomerase. Oncogene 21(4):522-31. Review.

Lunetta, K.L., D'Agostino, R.B. Sr, Karasik, D., et al. (2007) Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham Study. BMC Med Genet 8 (S1):S13.

Maheux, R., Naud, F., Rioux, M., et al. (1994) A randomized double-blind placebo-controlled study on the effect of conjugated estrogens on skin thickness. Am J Obstet Gynecol 170: 642-649.

Maiese, K., Chong, Z.Z., Shang, Y.C., et al. (2011) Translating cell survival and cell longevity into treatment strategies with SIRT1. Rom J Morphol Embryol 52(4):1173-85. Review.

Mair, W., Goymer, P., Pletcher, S.D., et al. (2003). Demography of Dietary Restriction and Death in *Drosophila*. Science 301 (5640): 1731-1733.

Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., et al. (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. Hum Mol Genet 15(9):1437-49.

Mao, L., Franke, J. (2013) Hormesis in aging and neurodegeneration-a prodigy awaiting dissection. Int J Mol Sci 14(7):13109-28.

Marino, G., Ugalde, A.P., Fernandez, A.F., et al. (2010) Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc Natl Acad Sci* 107(37):16268-73.

Marionnet, C., Bernerd, F., Dumas, A. et al. (2003) Modulation of gene expression induced in human Epidermis by environmental stress *in vivo*. *J Invest Dermatol* 121:1447-1458.

Marionnet, C, Pierrard, C., Vioux-Chagnoleau, C., et al. (2006) Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 126 (5), 971-979.

Matheu, A., Maraver, A., Klatt, P., et al. (2007) Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448(7151):375-9.

Maures, T.J., Greer, E.L., Hauswirth, A.G., et al. (2011) The H3K27 demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* lifespan in a germline-independent, insulin-dependent manner. *Aging Cell* 10(6):980-90.

McCauley, B.S., Dang, W. (2014) Histone methylation and aging: Lessons learned from model systems. *Biochim Biophys* 1839(12):1454-1462.Review.

Medvedik, O., Lamming, D.W., Kim, K.D., et al. (2007) MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* 5(10):e261.

Meissner, C., Bruse, P., Mohamed, S.A., et al. (2008) The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker or more? *Exp Gerontol* 2008 43(7):645-52.

Melendez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., et al. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301(5638):1387-91.

Mentis, A. FA., Kararizou, E. (2010) Does ageing originate in utero? *Biogerontology* 11: 725-729. Review.

Messenger AG. (2011) Hair through the female life cycle. *Br J Dermatol* 2011 165(S 3):2-6. Review.

Milman, N., Kirchhoff, M. (1992) Iron stores in 1359, 30-to 60-year old Danish women: evaluation by serum ferritin and hemoglobin. *Ann Hematol* 64: 22-7.

Mine S, Fortunel N.O, Paeon, H., et al. (2008) Aging alters functionally human dermal papillaryfibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging, *PLoSone* 3(12):e4066.

Minois, N., Khazaeli, A.A., Curtsinger, J.W. (2001) Locomotor activity as a function of age and life span in *Drosophila melanogaster* overexpressing hsp70. *Exp Gerontol* 36(7):1137-53.

Mitchell, J.R., Wood, E., Collins, K. (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402(6761):551-5.

Molofsky, A.V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M. et al. (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443(7110):448-52.

Montagna, M., Kligman, A.M. Carlisle K.S. (1992) Atlas of normal Human Skin. Springer-Verlag Ed., New york, Inc.

Moreno-Gonzalez, I., Soto, C. (2012) Natural animal models of neurodegenerative protein misfolding diseases. *Curr Pharm Des.* 18(8):1148-58. Review.

Morrow, G., Samson, M., Michaud, S., et al. (2004) Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J* 18(3):598-9.

Moskalev, A.A., Shaposhnikov, M.V., Plyusnina, E.N., et al. (2013) The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev* 12(2):661-84.

Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., et al. (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124(2):315-29.

Muftuoglu, M., Oshima, J., von Kobbe, C., et al. (2008) The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. *Hum Genet* 124 (4):369–377.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1-13.

Murphy, C.T., Lee, S.J., Kenyon, C. (2007) Tissue entrainment by feedback regulation of insulin gene expression in the endoderm of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci* 104(48): 19046–19050.

Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., et al. (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8(1):e1000298.

Narita, M., Young, A.R., Arakawa, S., et al. (2011) Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* 332(6032):966-70.

Navarro, A., Boveris, A. (2004) Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(5):R1244-9.

Nayal, A., Webb, D.J., Horwitz, A.F. (2004) Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 16(1):94-8. Review.

Naylor, E.C., Watson, R.E.B., Sherratt, M.J. Molecular aspects of skin aging (2011) *Maturitas* 69: 249-246.

Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., et al. (2012) A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* 11(2):345-9.

Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., et al. (2007) DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447(7145):686-90.

Niki, E. (2009) Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 47(5):469-84. Review.

Nouveau S, Bastien P, Baldo F, et al. (2008) Effects of topical DHEA on aging skin: a pilot study. *Maturitas* 59(2):174-81.

Oh, J.H., Kim, Y.K., Jung, J.Y. et al. (2011) Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin in vivo. *Exp Dermatol* 20(5):454-6.

Oh, J., Lee, Y.D., Wagers, A.J. (2014) Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med* 20(8):870-80. Review.

Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., et al. (1987) Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 262(12):5488-91.

Olsen, E.A., Reed, K.B., Cacchio, P.B., et al. (2010) Iron deficiency in female pattern hair loss, chronic telogen effluvium, and control groups. *J Am Acad Dermatol* 63(6):991-9.

Orozco-Solis, R., Sassone-Corsi, P. (2014) Circadian clock: linking epigenetics to aging. *Curr Opin Genet Dev* 26C:66-72.

Palacios, J.A., Herranz, D., De Bonis, M.L., et al. (2010) SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. *J Cell Biol* 191(7):1299-313.

Palm, W., de Lange, T. (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 42:301-34. Review.

Pamplona, R. (2008) Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 1777(10):1249-62.

Panhard, S., Lozano, I., Loussouarn, G. (2012) Greying of the human hair: a worldwide survey, revisiting the '50' rule of thumb. *Br J Dermatol* 167(4):865-73.

Paquet, F., Piérard-Franchimont, C., Fumal, I., et al. (1987) Sensitive skin at menopause; dew point and electrometric properties of the stratum corneum. *Obstet Gynecol* 70(6):840-5.

Park, C.B., Larsson, N.G. (2010) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 193(5):809-18.

Park, S., Mori, R., Shimokawa, I. (2013) Do sirtuins promote mammalian longevity? A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction. *Mol Cells* 35(6):474-80. Review.

Pawlikowska, L., Hu, D., Huntsman, S., et al. (2009) Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging Cell* 8(4):460-72.

Pearce, D.J., Anjos-Afonso, F., Ridler, C.M., et al. (2007) Age-dependent increase in side population distribution within hematopoiesis: implications for our understanding of the mechanism of aging. *Stem Cells* 25(4):828-35.

Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis K.N., et al. (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* 8(2):157-68.

Pegoraro, G., Kubben, N., Wickert, U., et al. (2009) Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex. *Nat Cell Biol* 11(10):1261-7.

Pélissier-Alicot, A.L., Léonetti, G. (2003) *Annales de Biologie Clinique* 61(1): 41-8. Revues générales.

Perez, V.I., Buffenstein, R., Masamsetti, V., et al. (2009) Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci* 106(9):3059-64.

Petropoulos, I., Conconi, M., Wang, X., et al. (2000) Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55(5):B220-7.

Piérard-Franchimont, C., Loussouarn, G., Panhard, S., et al. (2013) Immunohistochemical patterns in the interfollicular Caucasian scalps: influences of age, gender, and alopecia. *Biomed Res Int* 769489.

Piraccini, B.M., Alessandrini, A. (2014) Androgenetic alopecia. *G Ital Dermatol Venereol* 149(1):15-24. Review.

Pollina, E.A., Brunet, A. (2011) Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene* 30(28):3105-26. Review.

Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., et al. (1996) Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274(5290):1197-9.

Pont, A.R., Sadri, N., Hsiao, S.J., et al. (2012) mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance, and suppression of senescence by activation of telomerase transcription. *Mol Cell* 47(1):5-15.

Poulardier, F., Cornillon, C., D'arras, M.F., et al (2013) Functional and structural age-related changes in the scalp skin of Caucasian women. *Skin Res Technol* 19(4):384-93.

Powers, E.T., Morimoto, R.I., Dillin, A., et al. (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 78:959-91.

Purvis, J.E., Karhohs, K.W., Mock, C., et al. (2012) p53 dynamics control cell fate. *Science* 336(6087):1440-4.

Puyal, J., Ginet, V., Vaslin, A., et al. (2009) The two faces of autophagy in the nervous system. *Med Sci* 25(4):383-90. Review.

Qiu, X., Brown, K., Hirsche, M.D. et al. (2010). Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab* 12(6):662-7.

Quan, T., Qin, Z., Robichaud, P., et al. (2011) CCN1 contributes to skin connective tissue aging by inducing age-associated secretory phenotype in human skin dermal fibroblasts. *J Cell Commun Signal* 5(3):201-7.

Quan, T., Shao, Y., He, T., et al. (2010) Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. *J Invest Dermatol* 130(2):415-24.

Racila, D., Bickenbach, J.R. (2009) Are epidermal stem cells unique with respect to aging? *Aging* 1(8):746-50.

Raddatz, G., Hagemann, S., Aran, D., et al. (2013) Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis. *Epigenetics Chromatin* 6(1):36.

Rakyan, V.K., Down, T.A., Maslau, S., et al. (2010) Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res* 20(4):434-9.

Ramos, F.J., Kaeberlein, M. (2012) Ageing: A healthy diet for stem cells. *Nature* 486(7404):477-8.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., et al. (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 90(4):1383-435.

Rebora, A., Guarrera, M. (2002) Kenogen. A new phase of the hair cycle? *Dermatology* 205(2):108-10.

Renner, O., Carnero, A. (2009) Mouse models to decipher the PI3K signaling network in human cancer. *Curr Mol Med* 9(5):612-25. Review.

Richter, C. (1995) Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 27(7):647-53.

Robbins, C., Mirmirani, P., Messenger, A.G., et al. (2012) What women want-quantifying the perception of hair amount: an analysis of hair diameter and density changes with age in caucasian women. *Br J Dermatol* 167(2):324-32.

Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., et al. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118.

Rodriguez, K.A., Osmulski, P.A., Pierce, A., et al. (2014) A cytosolic protein factor from the naked mole-rat activates proteasomes of other species and protects these from inhibition. *Biochim Biophys Acta* 1842(11):2060-72.

Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J. et al. (2007) Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447(7145):725-9.

Rötig, A. (2004) mtDNA mutator mice: an ageing model *Med Sci* 20(10):847.

Rubinsztein, D.C., Marino, G., Kroemer, G. (2011) Autophagy and aging. *Cell* 146:682–695.

Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., et al. (2001) Glycosylation and the immune system. *Science* 291(5512):2370-6. Review.

Rushton, D.H. Nutritional factors and hair loss. (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:396-404.

Rushton, D.H., Bergfeld, W.F., Gilkes, J.J., et al. (2011) Iron deficiency and hair loss-nothing new? *J Am Acad Dermatol*. 65(1):203-4.

Rushton, D.H., Ramsay, I.D. (1992) The importance of adequate serum ferritin levels during oral cyproterone acetate and ethinyl oestradiol treatment of diffuse androgen-dependent alopecia in women. *Clin Endocrinol* 36(4):421-7.

Ruzankina, Y., Schoppy, D.W., Asare, A. et al. (2009) Tissue regenerative delays and synthetic lethality in adult mice after combined deletion of Atr and Trp53. *Nat Genet* 41(10):1144-9.

Sadagurski, M., Leshan, R.L., Patterson, C., et al. (2011) IRS2 increases mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a mouse model of Huntington disease. *J Clin Invest* 121:4070–4081.

Sadri, N., Schneider, R.J. (2009) *Auf1/Hnnpd*-deficient mice develop pruritic inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol* 129(3):657-70.

Safdar, A., Bourgeois, J.M., Ogborn, D.I., et al. (2011) Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. *Proc Natl Acad Sci* 108(10):4135-40.

Sagiv, A., Krizhanovsky, V. (2013) Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology* 14(6):617-28. Review.

Sahin, E., DePinho, R.A. (2010) Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 464:520-528.

Sahin, E., DePinho, R.A. (2012) Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(6):397-404. Review.

Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A. (2012) Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* 4(3):166-75.

Sander, C.S., Chang, H., Salzmann, S., et al. (2002) Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 118(4):618-25.

Sarg, B., Koutzamani, E., Helliger, W., et al. (2002) Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *J Biol Chem* 277(42):39195-201.

Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L., et al. (2006) The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 75:435-65. Review.

Savvas, M., Bishop, J., Laurent, G., et al. (1993) Type III collagen content in the skin of postmenopausal women receiving oestradiol and testosterone implants. *Brit J Obstet Gynaecol* 100: 154-156.

Scaffidi, P., Misteli, T. (2005) Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11(4):440-5.

Scaffidi, P., Misteli, T. (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312(5776):1059-63.

Scaffidi, P., Misteli, T. (2008) Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol* 10(4):452-9.

Schroeder, P., Haendeler, J., Krutmann, J. (2008) The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Exp Gerontol* 43(7):629-32. Review.

Schuettengruber, B., Cavalli, G. (2013) Polycomb domain formation depends on short and long distance regulatory cues. *PLoS One* 8(2):e56531.

Schumacher, B., Garinis, G.A., Hoeijmakers, J.H. (2008) Age to survive: DNA damage and aging. *Trends Genet* 24(2):77-85. Review.

Schwarze, S.R., Lee, C.M., Chung, S.S., et al. (1995) High levels of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of old rhesus monkeys. *Mech Ageing Dev* 83(2):91-101

Selman, C., Tullet, J.M., Wieser, D., et al. (2009) Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* 326(5949):140-4.

Sena, L.A., Chandel, N.S. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48(2):158-67. Review.

Senovilla, L., Galluzzi, L., Zitvogel, L. (2013) Immunosurveillance as a regulator of tissue homeostasis. *Trends Immunol* 34(10):471-81.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., et al. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88(5):593-602.

Severino, J., Allen, R.G., Balin, S., et al. (2000) Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res* 257(1):162-71.

Sharma, S., Dewald, O., Adroque, J., et al. (2006) Induction of antioxidant gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 40 (12):2223-2231.

Sharpless, N.E., DePinho, R.A. (2004) Telomeres, stem cells, senescence and cancer. *J Clin Invest* 113(2):160-168. Review.

Shay, J.W., Wright, W.E. (2011) Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* 21(6):349-53. Review.

Shaw, A.C., Joshi, S., Greenwood, H., et al. (2010) Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 22(4):507-13.

Sheaffer, K.L., Updike, D.L., Mango, S.E. (2008) The Target of Rapamycin pathway antagonizes pha-4/FoxA to control development and aging. *Curr Biol*. 18(18):1355-64.

Sherratt, M.J. (2009) Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age* 31(4):305-25. Review.

Shin, M.H., Rhie, G.E., Park, C.H., et al. (2005) Modulation of collagen metabolism by the topical application of dehydroepiandrosterone to human skin. *J Invest Dermatol* 124:315-323.

Shoemark, D.K., Allen, S.J. (2015) The microbiome and disease: reviewing the links between the oral microbiome, aging, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 43(3):725-38.

Shumaker, D.K., Dechat, T., Kohlmaier, A., et al. (2006) Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci* 103:8703-8708.

Sinclair, R. (2002) There is no clear association between low serum ferritin and chronic diffuse telogen hair loss. *Br J Dermatol* 147:982-4.

Sinclair, R., Jolley, D., Mallari, R., et al. (2004) The reliability of horizontally sectioned scalp biopsies in the diagnosis of chronic diffuse telogen hair loss in women. *J Am Acad Dermatol* 51(2):189-99.

Singh, S.R. (2012) Stem cell niche in tissue homeostasis, aging and cancer. *Curr Med Chem* 19(35):5965-74. Review.

Smith-Vikos, T., Slack, F.J. (2012) MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci* 125(Pt 1):7-17.

Soga, H. (2012) Changements avec l'âge du cuir chevelu et du cheveu et proposition d'un soin efficace. *Fragrance Journal* (10):11-15.

Spector, T., Lauc, G. (2013) Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69(7):779-89.

Suh, Y., Atzmon, G., Cho, M.O., et al. (2008) Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc Natl Acad Sci* 105(9):3438-42.

Sun, F., Kanthasamy, A., Anantharam, V., et al. (2009). Mitochondrial accumulation of polyubiquitinated proteins and differential regulation of apoptosis by polyubiquitination sites Lys-48 and -63. *J Cell Mol Med* 13(8B):1632-43.

Talens, R.P., Christensen, K., Putter, H., et al. (2012) Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11(4):694-703.

Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y. (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146(6):1016-28.

Tawa, R., Ono, T., Kurishita, A., et al. (1990) Changes of DNA methylation level during pre-and postnatal periods in mice. *Differentiation* 45(1):44-8.

Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J. et al. (2013) Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 123(3):966-72. Review.

Terman, A., Sandberg, S. (2002) Proteasome inhibition enhances lipofuscin formation. *Ann N Y Acad Sci* 973:309-12.

Teschendorff, A.E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., et al. (2010) Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res* 20(4):440-6.

Tissenbaum, H.A., Guarente, L. (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410(6825):227-30.

Toth ML, Sigmond T, Borsos E, et al. (2008) Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 4(3):330-8.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., et al. (2007) FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 128:325–339.

Tower, J. (2011) Heat shock proteins and *Drosophila* aging. *Exp Gerontol* 46(5):355-62.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., et al. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429:417-423.

Trüeb, R.M. (2003) Association between smoking and hair loss: another opportunity for health education against smoking? *Dermatology* 206:189-91.

Tsurumi, A., Li, W.X. (2012) Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics* 7(7):680-8.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., et al. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27(2):433-46.

Tzellos, T.G., Klagas, I., Vahtsevanos, K., et al. (2009) Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Exp Dermatol* 18(12):1028-35.

Ugarte, N., Petropoulos, I., Friguet, B. (2010) Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 13(4):539-49.

Uitto, J., Fazio, M.J., Olsen, D.R. (1989) Molecular mechanisms of cutaneous aging. Age-associated connective tissue alterations in the dermis. *J Am Acad Dermatol* 21(3 Pt 2):614-22. Review.

Ungvari, Z., Ridgway, I., Philipp E.E., et al. (2011) Extreme longevity is associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66(7):741-50.

Valdes, A.M., Andrew, T., Gardner, J.P., et al. (2005) Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366(9486):662-4.

Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., et al. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304(5674):1158-60.

Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., et al. (2006) Decreased collagen production in chronologically aged skin. *Am J Pathol* 168:1861-1868.

Varani, J., Schuger, L., Dame, M.K., et al. (2004) Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J Invest. Dermatol* 122(6):1471-1479.

Varela, I., Cadinanos, J., Pendas, A.M., et al. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in *Zmpste24* protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437(7058):564-8.

Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A.P., et al. (2008) Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 14(7):767-72.

Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., et al. (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426(6967):620.

Vernace, V.A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T. (2007) Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J* 21(11):2672-82.

van Deursen JM. (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509(7501):439-46. Review.

Varela, I., Cadinanos J, Pendas, A.M., et al. (2005) Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437(7058):564-8.

Viswanathan, M, Guarente, L. (2011) Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by sir-2.1 transgenes. *Nature* 477(7365):E1-2.

Von Zglinicki, T., Nilsson, E., Döcke, W.D., et al. (1995) Lipofuscin accumulation and ageing of fibroblasts. *Gerontology* 41 (S2):95-108.

Vredevelde, L.C., Possik, P.A., Smit, M.A., et al. (2012) Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev* 2012 26(10):1055-69.

Vuillermoz, B., Wegrowski, Y., Contet-Audonneau, J.L., et al. (2005) Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 277 (1-2) 63-72.

Wagers, A.J. (2012) The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell* 10(4):362-9. Review.

Wallace, D.C. (2001) A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp*. 235:247-63; discussion 263-6. Review.

Waller, J.M., Maibach, H.I. (2006) Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res Technol* 12(3):145-54. Review.

Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55(11):2284-92.

Wang, M.C., O'Rourke, E.J., Ruvkun, G. (2008) Fat Metabolism Links Germline Stem Cells and Longevity in *C. elegans*. *Science* 322 (5903) 957-960.

Wang, C.M., Tsai, S.N., Yew, T.W., et al. (2010) Identification of histone methylation multiplicities patterns in the brain of senescence-accelerated prone mouse 8. *Biogerontology* 11(1):87-102.

Watson, R.E., Ball, S.G., Craven, N.M., et al. (2001) Distribution and expression of type VI collagen in photoaged skin. *Br J Dermatol* 144(4):751-9.

Watson, R.E., Griffiths, C.E., Craven, N.M. et al. (1999) Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction. *J Invest Dermatol* 112(5):782-7.

Wei, Y.H., Lu, C.Y., Wei, C.Y., et al. (2011) Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 44(1):1-11. Review.

Wei, M., Madia, F., Longo, V.D. (2011) Studying age-dependent genomic instability using the *S. cerevisiae* chronological lifespan model. *J Vis Exp* (55) e3030.

Wei, Y., Scholes, C.P., King, T.E. (1981) Ubisemiquinone radicals from the cytochrome b-c1 complex of the mitochondrial electron transport chain-demonstration of QP-S radical formation. *Biochem Biophys Res Commun* 99:1411–1419.

Westerheide, S.D., Ankar, J., Stevens, S.M. Jr, et al. (2009) Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323(5917):1063-6.

Whiting, D.A. (1993) Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 28(5 Pt 1):755-63.

Whitton, J.T., Overall, J.D. (1973) The thickness of the epidermis. *Br J Dermatol* 89(5):467-76.

Willcox, B.J., Donlon, T.A., He, Q., et al. (2008) FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci* 105(37):13987-92.

Wilson, V.L., Jones, P.A. (1983) DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 220(4601):1055-7.

Wolf, J., Weinberger, B., Arnold, C.R., et al. (2012) The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts. *Exp Gerontol* 47(9):749-53.

Wood, J.G., Hillenmeyer, S., Lawrence, C., et al. (2010) Chromatin remodeling in the aging genome of *Drosophila*. *Aging Cell* 9(6):971-8.

Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Yao, Z., et al. (2008) PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One* 3(6):e2455.

Wright, C.I., Kroner, C.I., Draijer, R. (2006) Non-invasive methods and stimuli for evaluating the skin's microcirculation. *J Pharmacol Toxicol Methods* 54(1):1-25. Review.

Xie, J., Zhang, X., Zhang, L. (2013) Negative regulation of inflammation by SIRT1. *Pharmacol Res* 67(1):60-7. Review.

Yaar, M., Eller, M.S. Gilchrest, B.A. (2002) Fifty years of skin aging. *J Investig Dermatol Symp Proc* 7(1):51-8. Review.

Yaar, M., Gilchrest, B.A. (2007) Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol* 157(5):874-87. Review.

Yang, S.H., Bergo, M.O., Toth, J.I., et al. (2005) Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci* 102(29):10291-6.

Yilmaz, O.H., Katajisto, P., Lamming, D.W., et al. (2012) mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* 486(7404):490-5.

Yoon, Y.S., Yoon, D.S., Lim, I.K. et al (2006) Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *J Cell Physiol* 209(2):468-80.

Yokoo, S., Furumoto, K., Hiyama, E., et al. (2004) Slow-down of age-dependent telomere shortening is executed in human skin keratinocytes by hormesis-like-effects of trace hydrogen peroxide or by anti-oxidative effects of pro-vitamin C in common concurrently with reduction of intracellular oxidative stress. *J Cell Biochem* 93(3):588-97.

Youle, R.J., van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337(6098):1062-5.

Young, A.R., Narita, M. (2010) Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* 22(2):234-40.

Young, S.G., Yang, S.H., Davies, B.S., et al. (2014) Targeting protein prenylation in progeria. *Sci Transl Med* 5(171):171ps3.

Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., et al. (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272(5259):258-62.

Zapico, S.C., Ubelaker, D.H. (2013) mtDNA mutations and their role in aging, diseases and forensic sciences. *Aging Dis* 4(6):364-80. Review.

Zhang, C., Bills, M., Quigley, A., et al. (1997) Varied prevalence of age-associated mitochondrial DNA deletions in different species and tissues: a comparison between human and rat. *Biochem Biophys Res Commun* 230(3):630-5.

Zhang, C., Cuervo, A.M. (2008) Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat Med* 14(9):959-65.

Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., et al. (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135(1):61-73.

Zheng, Q., Chen, S., Chen, Y. et al. (2012) Critical role of paxillin in aging of human skin. *J Invest Dermatol* 132(4):1290-3.

Zid, B.M., Rogers, A.N., Katewa, S.D. et al. (2009) 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell* 139(1):149-60.

Ziv, E., Hu, D. (2011) Genetic variation in insulin/IGF-1 signaling pathways and longevity. *Ageing Res Rev* 10:201-204.

Zobiri, O., Deshayes, N., Rathman-Josserand, M. (2012) Evolution of the clonogenic potential of human epidermal stem/progenitor cells with age. *Stem Cells Cloning* 5:1-4.

Zou, Y., Sfeir, A., Gryaznov, S.M., et al. (2004) Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? *Mol Biol Cell* 15(8):3709-18.

ANNEXES

PUBLICATIONS TRAVAUX SCIENTIQUES ARTICLES CHEVEU

Hair Diameter Diversity

A Clinical Sign Reflecting the Follicle Miniaturization

Olivier de Lacharrière, MD; Claire Deloche, MSc; Cosimo Misciali, MD;
Bianca Maria Piraccini, MD; Colombina Vincenzi, MD; Philippe Bastien, MSc;
Isabelle Tardy, MD; Bruno A. Bernard, PhD; Antonella Tosti, MD.

Background: The degree of androgenetic alopecia is generally evaluated either by global clinical scales or time-consuming methods like phototrichogram or histological studies. We describe a new clinical and reliable scoring method based on hair diameter diversity.

Observations: (1) The clinical macroscopic scoring we propose for hair density was significantly correlated with Hamilton classification and with histological hair density. (2) Diversity in hair diameter was the main and most accurate clinical parameter linked to follicle miniaturization. (3) The anagen-telogen ratio decreased in parallel with the decrease in clinical hair density score.

Conclusions: Considering that hair follicle miniaturization is the key point during androgenic alopecia onset and development, diversity in hair diameter represents an important feature to consider as an accurate clinical sign reflecting hair follicle miniaturization. Moreover, diversity in hair diameter seems to be an easily accessible and reliable parameter that should be taken into consideration for further characterization of hair disorders. By itself, we believe that this clinical feature constitutes a new tool of substantial help for the diagnosis and management of androgenic alopecia.

Arch Dermatol. 2001;137:641-646

MALE PATTERN alopecia is a common disorder in men, characterized by a progressive miniaturization of hair follicles whereby terminal hair evolves into vellus hair. The distribution and incidence of androgenic alopecia was first documented by Hamilton.¹ Up to now the degree of androgenic alopecia was evaluated using global clinical scales such as those proposed by Hamilton,¹ Ludwig,² and Savin,³ or more accurately with technical methods. Among others, the phototrichogram^{4,5} is a noninvasive technique, well recognized by physicians, and used as a routine examination procedure to assess both the degree of alopecia and treatment efficacy. It is based on the determination of hair cycle duration and anagen-telogen ratio. Other methods such as hair weight,⁶ transverse microscopic analysis,⁷ and unit area trichogram⁸ have also been proposed.

We have recently developed a simple, rapid, and reproducible clinical procedure to describe the scalp semiology during androgenic alopecia. This method was developed by studying 850 scalp macrophotographs taken from a large group of male volunteers involved in a French health national program called

"SUVIMAX."^{9,10} Macrophotograph scoring led us to qualitatively characterize 3 fundamental hair parameters: hair density, hair diameter, and diversity in hair diameter.¹⁰ Furthermore, histological studies were performed to describe follicular features associated with the above clinical hair parameters. Namely, normal and abnormal follicles were identified and counted on horizontal microscopic sections.¹¹ This work was aimed at evaluating the reliability of this new clinical scoring approach by performing a quantitative histological study on those scalp areas previously scored from macrophotographs. The purpose was to establish a link between macroscopic scores of clinical parameters and microscopic assessment of follicular structures.

RESULTS

CLINICAL FEATURES

Hamilton Classification vs Local Hair Density on the Vertex Area

High scores of hair density (5 and 6) were mainly represented by very early stages of alopecia (I, II), whereas a decrease to lower scores of hair density (from 4 to 2) was reflected by a gradual worsening of alopecia

From Prospective Clinical Research (Dr de Lacharrière, Ms Deloche, and Mr Bastien), Hair Biology Group (Dr Bernard), L'Oréal Research, Life Science, Clichy, France; the Department of Dermatology, University of Bologna, Bologna, Italy (Drs Misciali, Piraccini, Vincenzi, and Tosti); and the Department of Dermatology, Hertford Hospital, Levallois-Perret, France (Dr Tardy).

(REPRINTED) ARCH DERMATOL/VOL 137, MAY 2001 WWW.ARCHDERMATOL.COM

Downloaded from www.archdermatol.com at L-OREAL CNT CHARLES ZVIAK SCE, on October 14, 2009
©2001 American Medical Association. All rights reserved.

PATIENTS AND METHODS

PATIENTS

After study approval by the ethical committee of the University of Bologna (January 1998), Bologna, Italy, 21 men aged 19 to 51 years (median age, 27 years; mean \pm SEM age, 29 ± 1.57 years) with androgenic alopecia gave their informed consent to participate in the investigation. Their demographic characteristics are given in **Table 1**. The study took place between January 1998 and May 1999.

METHODS

Macrophotographs and Clinical Scoring

Macrophotographs were taken on a delineated area, with a preadjusted macroscopic camera (Dermaphot; Heine Optotechnik, Herrsching, Germany) at an original magnification of $\times 4$. For each subject, the vertex area was delineated at the cross between nose line and ear implantation line, then located by a temporary tattoo. A center parting was made with a comb, and the separated hairs were fixed on either side of the part with an adhesive tape before taking the macrophotograph. From macrophotographs, we assessed the following clinical parameters: hair density, hair diameter, and diversity in hair diameter.

Two photographic scales were used for scoring these clinical parameters. The first scale was established for simultaneous scoring of hair density and hair diameter (**Figure 1**). The hair density scale was obtained by counting accurately the number of hairs on one side from center parting within a delineated rectangle on the photographed area that corresponded to a scalp area of 1.4×13 mm. The reference scores for hair density area were as follows: 1, baldness (<4 hairs); 2, very low hair density (5-10 hairs); 3, low hair density (11-20 hairs); 4, medium hair density (21-30 hairs); 5, high hair density (31-40 hairs); 6, very high hair density (>40 hairs).

Hair diameter was scored as 1 (thin), 2 (medium), and 3 (thick). The hair diameter clinical scale was checked with micrometer measurements on corresponding hairs: a score of 1 (very thin/thin) corresponds to 30 to 40 μ m; 2 (medium), 50 to 80 μ m; and 3 (thick), 90 to 110 μ m.

The scale used to score diversity in hair diameter (**Figure 2**) was graded as 0 ($<20\%$ in hair diameter diversity) and 1 ($>20\%$ in hair diameter diversity).

Handling of Biopsy Samples

For each subject, after administration of local anesthesia, a 4-mm punch biopsy sample was obtained from the photographed area by using the tattoo as a reference area. Samples were formalin fixed and paraffin embedded, and horizontal sections were performed according to the procedure outlined by Whiting.¹¹

Histological Analysis

Sections were stained with hematoxylin-eosin and then examined under a bright-field microscope. On each biopsy sample (4 mm in diameter), the following parameters were evaluated: total number of follicles (anagen plus telogen), number of meaningful anagen follicles,⁸ number of telogen follicles, and number of miniaturized follicles (defined as follicles measuring less than 0.03 mm in diameter).¹¹ Only meaningful⁸ anagen hairs were taken into consideration for the calculation of the anagen-telogen ratio.

Data Management and Statistical Analysis

First, the links between clinical and histological findings were displayed as box plots, showing the median and the interquartile range. Second, correlation tests were carried out using the Cochran-Mantel-Haenszel statistics^{12,13} based on standardized midranks. Descriptive and inferential analyses were performed using SPSS (version 9.0 for Windows; SPSS, Chicago, Ill) and SAS (version 6.2 for Windows; SAS, Cary NC) statistical software.

grading (from III to IV). Interestingly, there was a good correlation ($P=.01$) between the 2 clinical gradings (ie, global scores of Hamilton classification and macroscopic scores of hair density) (**Figure 3A**). This led us to further characterize the stage of alopecia according to our clinical macroscopic scale of hair density.

Hair Diameter and Hair Diameter Diversity vs Local Hair Density

To appreciate the score changes in hair diameter and hair diameter diversity in the 21 men involved in the study, we investigated their distribution according to changes in hair density. On the one hand, there was a good correlation between hair diameter diversity and hair density. **Figure 3B** shows a statistically significant increase in hair diameter diversity associated with a decrease in hair density score ($P=.02$). On the other hand, no statistical link was found between the distribution of hair diameters and the evolution of the hair density score ($P=.70$).

Table 1. Age of Patients and Hamilton Classification

Hamilton Classification	No. of Subjects (N = 21)	Median Age (Range), y
I	2	24.5 (19-30)
II	10	26.5 (23-32)
III	3	27 (24-32)
IV	5	32 (23-51)
VI	1	41

HISTOLOGICAL AND CLINICAL RELATIONSHIPS

Clinical Hair Density and Quantitative Histological Features

Clinical parameters were compared with quantitative histological parameters obtained from the same scalp

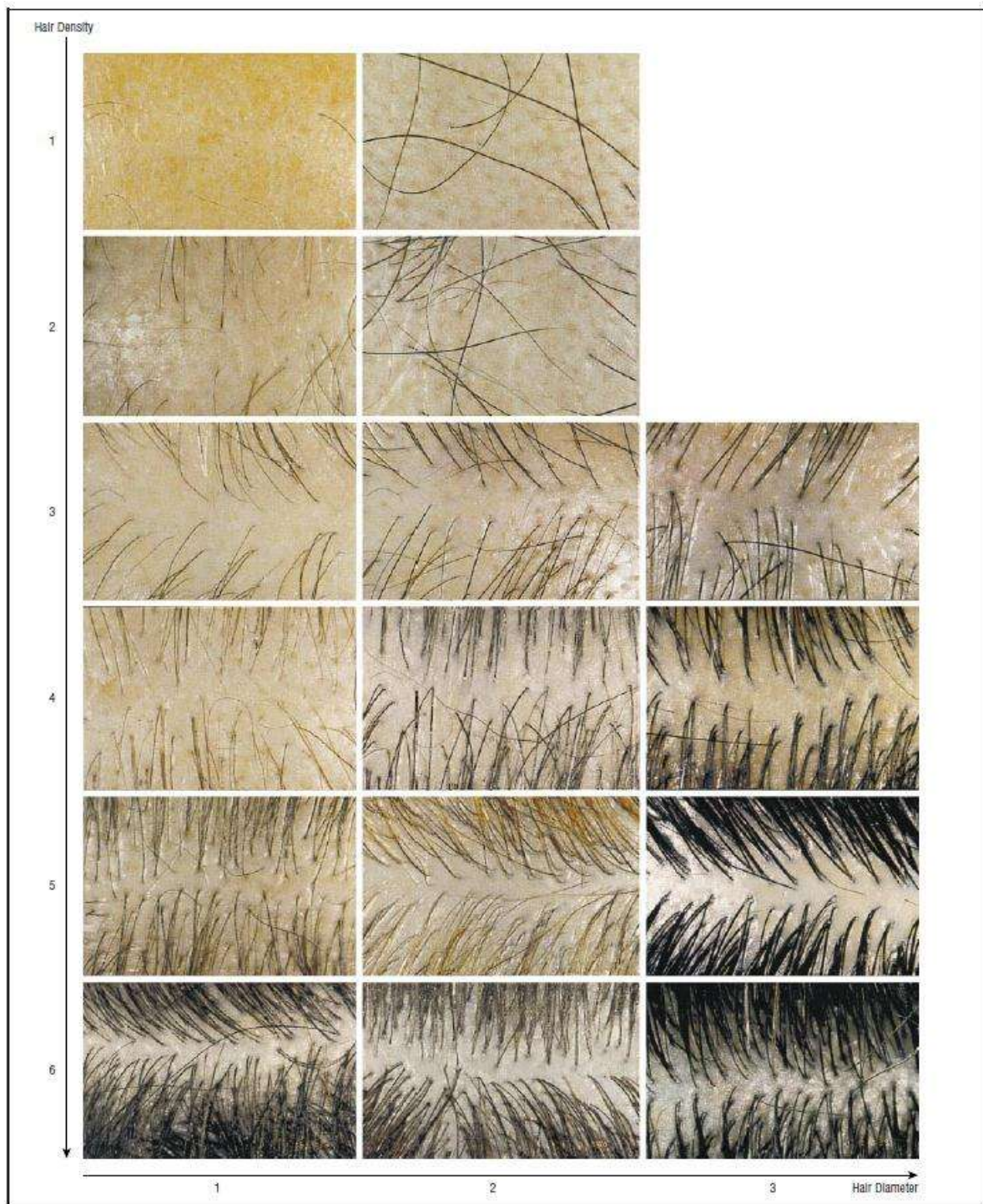


Figure 1. Clinical scoring of hair density and hair diameter using a photographic scale (original magnification $\times 4$).

area (**Table 2**). Clinical hair density scores were significantly correlated ($P=.006$) with hair density as assessed by histological analysis. The total number of anagen plus telogen follicles was higher when hair density increased (Figure 3C). With high hair density scores, the median number of anagen follicles increased

significantly ($P=.006$), whereas no change was found in the number of telogen follicles. There was a good trend ($P=.10$) in the reduction of the meaningful anagen-telogen ratio, paralleling the reduction in hair density score (Figure 3D). Nevertheless, the statistical significance could not be reached in this preliminary work,

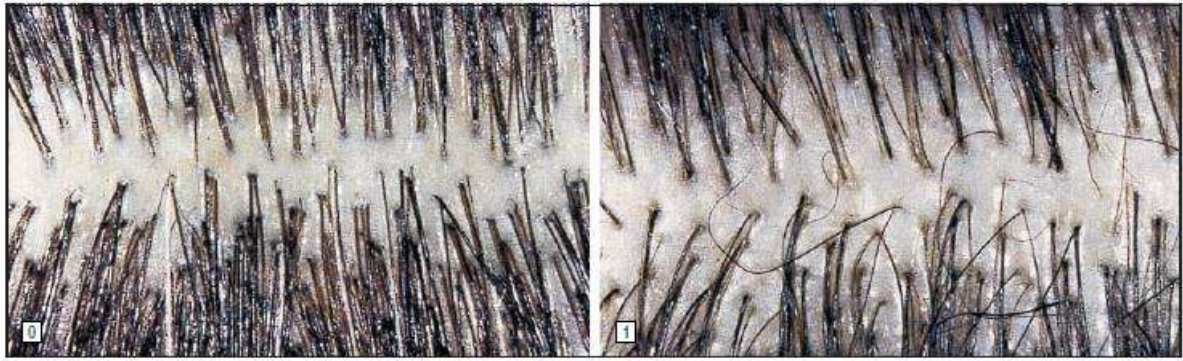


Figure 2. Hair diameter diversity scale (original magnification $\times 4$). A score of 0 indicates less than 20% hair diameter diversity; 1, more than 20% hair diameter diversity.

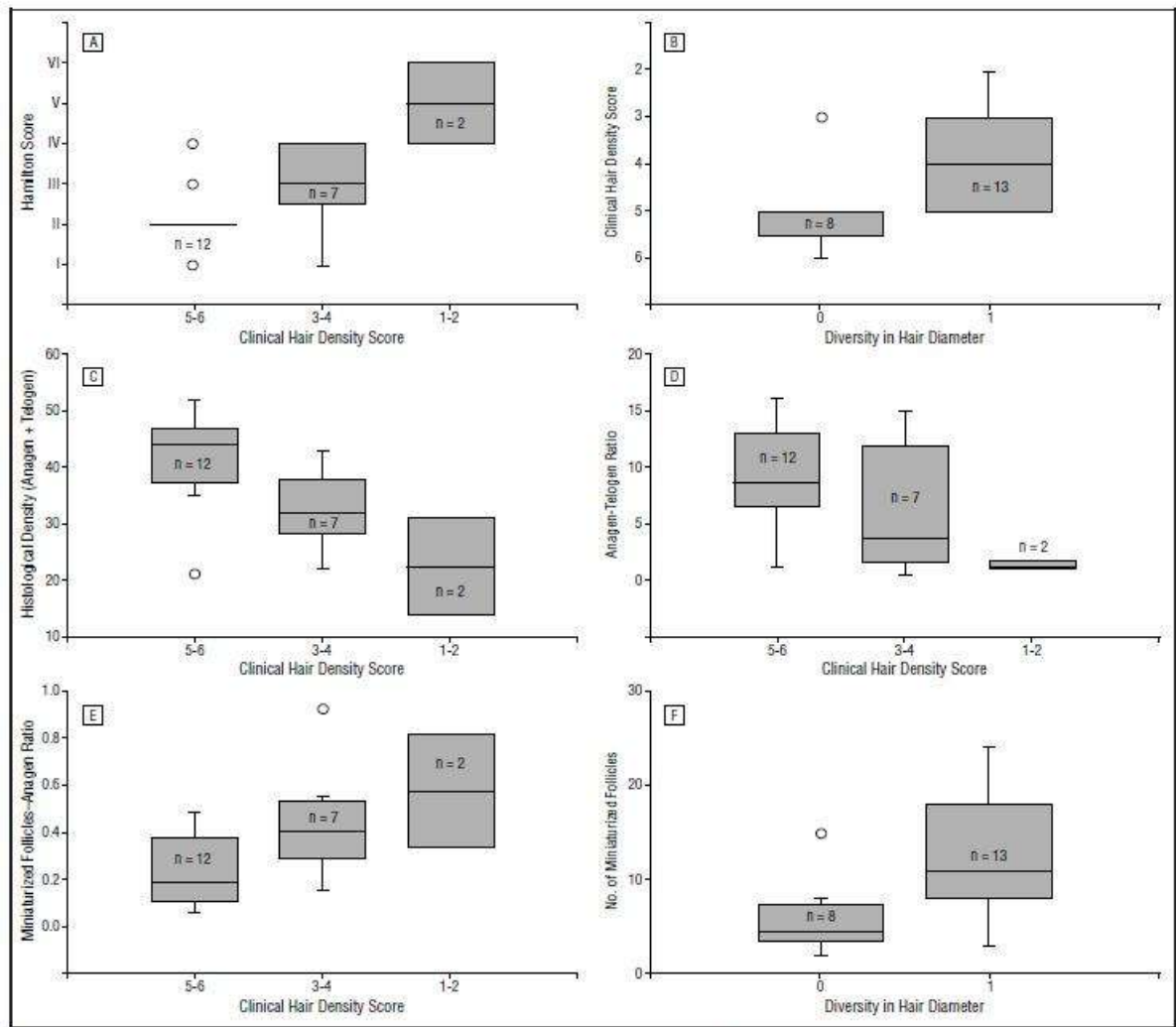


Figure 3. Statistical analysis of hair parameters. (For a full explanation of all scores and ratios, see the "Methods" subsection of the "Patients and Methods" section.) A, There is a significant relationship between global scores of the Hamilton and macroscopic hair density scores ($P = .01$); B, a significant increase in hair diameter diversity is associated with a hair density decrease ($P = .02$); C, there is a significant correlation between follicle histological density (total anagen plus telogen) and an increase in hair density score ($P = .006$); D, there is a correlation between the clinical hair density score and a meaningful anagen-telogen ratio ($P = .10$); E, a significant increase in the number of miniaturized follicles is associated with a decrease in hair density score ($P = .02$); F, there is a significant link between hair diameter diversity score and follicle miniaturization ($P = .02$). Each box represents values between the 25th and 75th percentiles; the horizontal line is the median. Circles mark cases with values more than 1.5 box lengths away from the 75th or 25th percentiles. The upper brackets extend to the largest value not exceeding the 75th percentile plus $1.5 \times$ the height of the box, while the lower brackets extend to the smallest value not below the 25th percentile minus $1.5 \times$ the height of the box.

(REPRINTED) ARCH DERMATOL/VOL 137, MAY 2001 WWW.ARCHDERMATOL.COM

644

Downloaded from www.archdermatol.com at L-OREAL CNT CHARLES ZVIAK SCE, on October 14, 2009

©2001 American Medical Association. All rights reserved.

Table 2. Histological Data on Horizontal Sections of Scalp Biopsy Samples According to Clinical Hair Density Score*

Clinical Hair Density Score	Histological Density (Total Anagen Plus Telogen Follicles)	No. of Meaningful Anagen Follicles	No. of Telogen Follicles	Meaningful Anagen-Telogen Ratio	No. of Miniaturized Follicles
6-5 (n = 12)	44.0 (21-52)	38.5 (20-45)	3.5 (1-14)	10.9 (1.9-22.5)	6.0 (2-20)
4-3 (n = 7)	32.0 (22-43)	26.0 (21-40)	4.0 (1-11)	6.5 (2.6-25)	10.0 (4-24)
2-1 (n = 2)	22.5 (14-31)	18.5 (9-28)	4.0 (3-5)	5.6 (1.8-9.3)	13.0 (3-23)

*Data are median (range) values. For a full explanation of scores and ratios, see "Methods" section.

probably owing to the small number of volunteers and real controls. Furthermore, the number of miniaturized follicles was inversely correlated with clinical hair density ($P=.02$) (Figure 3E).

Clinical Hair Diameter and Miniaturization of Hair Follicles

Finally, we investigated the link of clinical scoring of hair diameter and hair diameter diversity with histological features. Hair diameter diversity was significantly linked to the miniaturization degree of hair follicles ($P=.02$) (Figure 3F), whereas the link between follicle miniaturization and hair diameter showed a statistical trend ($P=.07$).

COMMENT

Hamilton,¹ in a pioneering work, classified male pattern baldness according to 8 stages. This classification is commonly used by the clinician for grading assessment. Our preliminary study showed that the macroscopic scores we proposed for hair density were significantly correlated with Hamilton classifications and furthermore correlated with histological hair density. Obtained from the same delineated area of the scalp, clinical macroscopic and histological data definitely established the reliability of our clinical scale for grading androgenic alopecia. The degree of alopecia could be assessed efficiently on the vertex area using the macroscopic clinical hair density scale we developed.

It has been established that during one's life span, androgenic alopecia is characterized by a decrease in the duration of the anagen period⁵ and a reduction of the anagen-telogen ratio.¹⁴ Our results tend to confirm that the meaningful anagen-telogen ratio decreases in parallel with the decrease in the local hair density score. It was also established that androgenic alopecia was characterized by a progressive reduction in hair shaft diameter.^{15,16} Although our study only demonstrates a trend for a link between the decrease in hair density and hair diameter, we found that hair density was significantly related to the decrease in hair diameter diversity. Our observations showed that the first change in hair diameter during androgenic alopecia was the emergence of diversity in hair diameter and highly suggested that diversity in hair diameter could be a reliable indicator of the balding process. Diversity of the hair diameter

probably results from the fact that hair miniaturization does not equally affect all the hair follicles of the same area, resulting in the simultaneous presence of terminal, indeterminate, and miniaturized hairs. Indeterminate hairs (0.03-0.06 mm in diameter) are rare in the normal scalp.¹⁷

Furthermore the link we showed between hair diameter diversity and hair follicle miniaturization strongly suggests that hair diameter diversity was the main and most accurate clinical sign reflecting the follicle miniaturization process. Although hair follicle miniaturization is the key point during androgenic alopecia, hair diameter diversity represents an important feature and should be considered an accurate, easily accessible, and reliable macroscopic clinical sign that could, from now on, be taken into consideration for further characterization of hair disorders. By itself, this clinical feature constitutes a new tool of substantial utility in the diagnosis and management of androgenic alopecia. Further studies, including analysis of scalp biopsy specimens from subjects not affected by androgenic alopecia, are needed to confirm our clinical-pathological correlations.

Accepted for publication February 5, 2001.

This work was supported by L'Oréal Research, Clichy, France.

We thank Anne Bielicki, Christine Collin, Stéphane Commo, and Yann Mahé for their helpful assistance, Claude Bouillon, PhD and David Whiting, PhD, for critical review of the manuscript, and Jacques Leclair for support of the work. We also thank Fiona Cleland and Daniel Antoine for their assistance in manuscript preparation.

Reprints: Olivier de Lacharrière, MD, L'Oréal Research, Life Science, Prospective Clinical Research, 90 rue du Général Roguet, Clichy 92100, France (e-mail: odelacharriere@recherche.loreal.com).

REFERENCES

- Hamilton JB. Patterned loss of hair in man: types and incidence. *Ann NY Acad Sci*. 1951;53:708-728.
- Ludwig E. Classification of the types of androgenic alopecia (common baldness) occurring in female sex. *Br J Dermatol*. 1997;97:247-254.
- Savin RC. A method for visually describing and quantitating hair loss in male pattern baldness [abstract]. *J Invest Dermatol*. 1992;98:604.
- Saitoh M, Uzuka M, Sakamoto M. Human hair cycle. *J Invest Dermatol*. 1970; 54:65-81.
- Courtois M, Lousouarn G, Hourseau C, Grollier JF. Hair cycle and alopecia. *Skin Pharmacol*. 1994;7:84-89.

6. Price WH, Menefee E, Strauss PC. Changes in hair weight and hair count in men with androgenetic alopecia after application of 5% and 2% topical minoxidil, placebo or no treatment. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41:717-721.
7. Headington JT. Transverse microscopic anatomy of the human scalp. A basis for a morphometric approach to disorders of the hair follicle. *Arch Dermatol*. 1984; 120:449-456.
8. Rusthoun DH, Ramsay ID, Norris MJ, Gilkes JJH. Natural progression of male pattern baldness in young men. *Clin Exp Dermatol*. 1991;16:188-192.
9. Hercberg S, Preziosi P, Briançon S, et al. A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SUVIMAX study design, methods, and participants characteristics. *Control Clin Trials*. 1998;19:336-351.
10. de Lacharrière O, Tardy I, Bielicki A, Tolle M, Bastien P, Leclaire J. Scalp examination by Dermatoscope®: a new clinical tool to describe the clinical microsemiology of androgenic alopecia [abstract]. *Australas J Dermatol*. 1997;38:97s.
11. Whiting DA. Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol*. 1993; 28:755-763.
12. Mantel N. Chi-square test with one degree of freedom: extensions of the Mantel-Haenszel procedure. *J Am Stat Assoc*. 1969;58:690-700.
13. Stokes ME, Davis CS, Koch GG. *Categorical Data Analysis Using the SAS System*. Cary, NC: SAS Institute Inc; 1995:59-80.
14. Peereboom JDR. Comparative studies of the diameters of hair shafts in anagen and in telogen phases in male adults without alopecia and in male adults with androgenic alopecia. In: Orfanos CE, Montagna W, Stüttgen G, eds. *Hair Research*. New York, NY: Springer-Verlag Inc; 1981:294-302.
15. Ishino A, Uzuka M, Tsuji Y, Nakanishi J, Hanzawa N, Imamura S. Progressive decrease in hair diameter in Japanese with male pattern baldness. *J Dermatol*. 1997;24:758-767.
16. Courtois M, Lousouarn G, Hourseau C, Grollier JF. Aging and hair cycle. *Br J Dermatol*. 1995;132:86-93.
17. Sperling LC, Lupton GP. Histopathology of nonscarring alopecia. *J Cutan Pathol*. 1995;22:97-114.

News & Notes

The International Society for Behçet's Disease, a multidisciplinary society, was inaugurated at the Ninth International Conference for Behçet's Disease in Seoul, South Korea, on May 28, 2000. The aim of the society is to advance the knowledge of the etiology, pathogenesis, diagnosis, natural history, clinical features, treatment, and management of Behçet's Disease. The Executive Committee is made up of the following members:

Committee Member

Dr Colin G. Barnes (UK)
 Professor Hasan Yazici (Turkey)
 Professor Sungnack Lee (Korea)
 Professor Dorian Haskard (UK)
 Professor Christos Zouboulis (Germany)

Position

President
 President Elect and Secretary
 Secretary
 Vice-President
 President of the 10th International Congress, Berlin, June 2002

Owing to the diverse clinical manifestations of Behçet's disease the founder members of the society include dermatologists, epidemiologists, gastroenterologists, immunologists, internal medicine physicians, neurologists, ophthalmologists, pathologists, and rheumatologists. Colleagues from any interested discipline, including nonmedical scientists, are encouraged to become members. Details are available from the secretary: Professor Hasan Yazici, Safa sok 17/7, Kadikoy, Istanbul 81310, Turkey; phone and fax: +90 216 337 8789 (e-mail: hyazici@attglobal.ne).

Claire Deloche · Olivier de Lacharrière · Cosimo Misciali
Bianca Maria Piraccini · Colombina Vincenzi
Philippe Bastien · Isabelle Tardy · Bruno A. Bernard
Antonella Tosti

Histological features of peripilar signs associated with androgenetic alopecia

Received: 20 May 2003 / Revised: 27 August 2003 / Accepted: 12 December 2003 / Published online: 31 January 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract *Background* A study of the scalp in a large cohort of volunteers with androgenetic alopecia using macrophotographs showed the presence of peripilar signs (PPS) around the hair ostia.

Objective The aim of the present study was to establish the histopathological features related to PPS.

Design Prospective clinicopathological study.

Setting Department of Dermatology, University Hospital of Bologna.

Patients A group of 40 patients (21 males and 19 females) participated in the study. Macrophotographs of the scalp were taken using a Dermaphot camera and PPS were scored using a three-point scale. Hair density and PPS were clinically scored according to reference scales. Two punch biopsies from the photographed area were obtained from each subject and histological analysis was performed on vertical and horizontal sections.

Observations Clinical parameters indicated that PPS were already detectable on scalp with high hair density. Moreover, in patients with high hair density (score >4), a significant relationship was found between the PPS score and the global score for perifollicular infiltrates. Thus PPS are linked to superficial perifollicular lymphocytic infiltrates in early androgenetic alopecia.

Conclusions PPS could be the clinical signs reflecting the presence of perifollicular infiltrates.

Keywords Scalp biopsy · Baldness · Fibrosis · Perifollicular infiltrate · Hair density

C. Deloche (✉) · O. de Lacharrière · P. Bastien · B. A. Bernard
Centre Charles Zviak, L'Oréal Recherche,
90 rue du Général Roguet, 92583 Clichy Cedex, France
Tel.: +33-1-47564287, Fax: +33-1-47568221,
e-mail: cdeloche@rd.loreal.com

C. Misciali · B. M. Piraccini · C. Vincenzi · A. Tosti
Department of Dermatology, University of Bologna,
via Massarenti 1, 40138 Bologna, Italy

I. Tardy
Department of Dermatology, Hôpital Franco Britannique,
12 rue Barbès, 92300 Levallois-Perret, France

Introduction

Androgenetic alopecia is a common disorder that affects men and women, and is characterized by the progressive transformation of terminal into vellus-like follicles through a miniaturization process ultimately resulting in balding areas. Histopathological and histochemical studies of androgenetic alopecia have frequently detected perifollicular and interfollicular lymphocytic infiltrates, mastocytes and fibrosis [1, 9, 10, 11, 22]. With regard to the dermatopathological findings, two main types of feature have been described: inflammatory signs and fibrosis. However, the significance and time-course of these histological signs in the process of androgenetic alopecia remain controversial and unclear.

We have recently studied scalp signs during the course of androgenetic alopecia and, being involved in a French Health National Program called "SUVIMAX" [8], we performed a clinical study on a large group of volunteers using scalp macrophotographs. A total of 850 pictures from men led us to identify the peripilar signs (PPS) which could be detected in androgenetic alopecia on the scalp surface. These are characterized by changes in the scalp appearance around the emergent hair shaft [4]. Although padding of the scalp surface could be observed, the most striking and conspicuous PPS was the presence of a brown halo, roughly 1 mm in diameter, at the follicular ostium.

The aim of the present study was to correlate clinical observations with histological changes at the same sites of the scalp in both males and females affected with androgenetic alopecia representing the Caucasian population.

Materials and methods

Patients

After study approval by the ethical committee of the University of Bologna (January 1998), 21 men aged 19 to 51 years (median 27 years; mean±SD 29±7.2 years) and 19 women aged 21 to 65 years (median 44 years; mean±SD 44.1±13.4) with androgenetic alope-

Table 1 Age of patients and alopecia classification

Type of androgenetic alopecia	No. of subjects (n=40)	Age (years)	
		Median	Range
Hamilton I	2	24.5	19–30
Hamilton II	10	26.5	23–32
Hamilton III	3	27	24–32
Hamilton IV	5	32	23–51
Hamilton VI	1	41	–
Ludwig I	4	36	25–60
Ludwig II	12	40.5	21–62
Ludwig III	3	53	42–60

cia [6, 12] gave their informed consent for entry into the study. The Hamilton grade of alopecia in males ranged from I to VI [6], and the Ludwig grade in females ranged from I to III [12] (Table 1).

Macrophotographs and clinical scoring

Macrophotographs were taken of a delineated scalp area using a Dermaphot® camera (Heine®, magnification ×2.5) as previously described [5]. In each subject, the vertex area was delineated at the intersection of the nose line and the ear implantation line, and then located by a temporary tattoo. A centre parting was made with a comb and parted hairs were fixed on both sides with adhesive tape before taking the macrophotograph. The camera was equipped with two different sets of lenses which ensured that the images

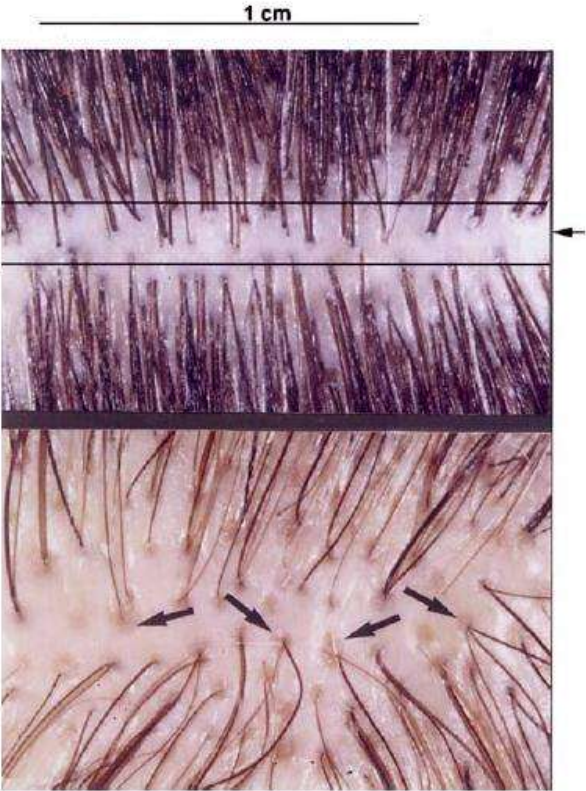


Fig. 1 Normal scalp (upper picture, arrow defined area for hair density assessment) and peripilar signs (lower picture, arrows)

were always taken at the same distance from the scalp. A “space” lens without contact with scalp skin which allowed routine views of the surface to be taken and a contact lens allowed the scalp surface to be smoothed and possible masking elements such as dandruff and sebum to be removed by using or not using immersion oil. Successive use of these lenses allowed the microsemiology of the scalp to be characterized more precisely. The macrophotographs showed specific PPS around the emerging hair shaft, the most typical feature being a brown halo located at the hair ostium (arrows, Fig. 1). PPS were scored as 0 (none), 1 (few or mild), 2 (average or moderate), or 3 (numerous or severe). Hair density was scored in a 4×36 mm defined area on the slide (see Fig. 1) using the following a reference scale: 1=baldness (<4 hairs); 2=very low hair density (5–10 hairs); 3=low hair density (11–20 hairs); 4=average hair density (21–30 hairs); 5=high hair density (31–40 hairs); and 6=very high hair density (>40 hairs).

Handling of biopsy samples

After administration of local anaesthesia, two adjacent punch biopsy samples (2 and 4 mm in diameter) were taken. In a subgroup of 34 volunteers (20 males with Hamilton grade I to VI, and 14 females with Ludwig grade I to III), an additional elliptical excisional biopsy was taken from the photographed area using the temporary tattoo as the reference area. Punch biopsies were then formalin-fixed and paraffin-embedded, while the elliptical biopsy was embedded in Tissue-Tek OCT compound (Miles, Naperville, Ill.), quickly frozen over dry ice and stored at –80°C until used for immunohistochemistry.

Histological analysis

Biopsy samples were cut either horizontally [7, 16, 20] or vertically [3] for routine histological and immunohistological analyses

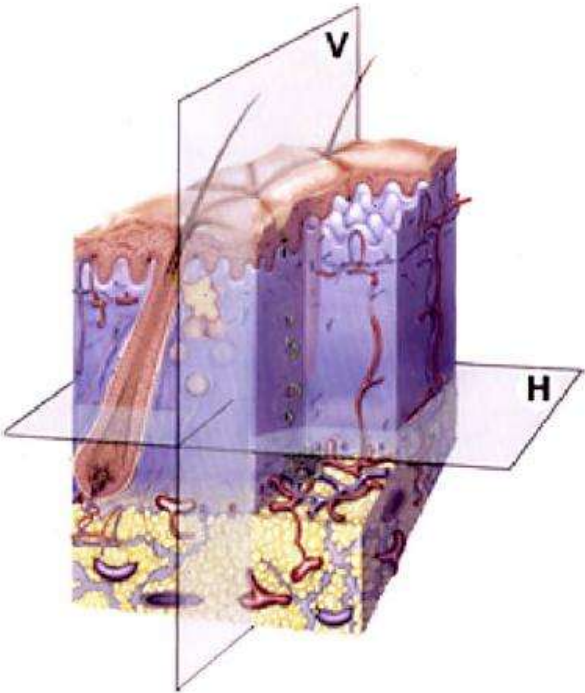


Fig. 2 Diagram showing sample processing for horizontal and vertical biopsy sections

(Fig. 2), and for measurement of epidermal thickness. Horizontal sections of embedded punch biopsies were obtained by serial cutting from the epidermis down to the hypodermis in order to obtain sections at different levels of the follicle. All sections were stained with hematoxylin and eosin, Fontana-Masson (to detect the presence of melanocytes in the dermis), or Alcian blue (to detect mucins), and examined under a bright-field microscope. According to the photographic rating of Whiting [20], the degree of lymphocytic or mastocytic infiltrates, fibroplasia or sclerosis were scored as 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate) or 3 (severe) in the following areas: papillary dermis, peri-sebaceous gland, peri-infundibulum, peri-isthmus, dermal sheath, dermal papilla and collagenous streamer. The scores corresponding to histological features were assessed at each level of the follicle for each volunteer. Then, a total score for each level was obtained by summing individual scores. In addition, epidermal thickness and follicle depth were measured from the vertical sections.

Immunohistochemistry

The elliptical biopsies were used for immunohistochemical analysis using a panel of markers for immunocompetent cells and dendrocytes, namely CD1a, CD4, CD8, HLA-DR (class II) and FXIIIa. Vertical frozen sections (5 µm) of hair follicles were prepared on a HM 500 M cryostat (Microm, Francheville, France). Immunolabelling was performed as previously described [3]. CD1a, CD4, CD8, HLA-DR labelling was performed on 34 volunteers (20 males with Hamilton grade I to VI and 14 females with Ludwig grade I to III) while FXIIIa staining was performed on a subset of 19 volunteers (11 males with Hamilton grade I to VI and 8 females with Ludwig grade I to III). The intensity of CD1a, CD4, CD8, HLA-DR (class II) and FXIIIa expression was graded on a scale of 0 to 4, from a few positive cells in the dermis (score 1) to large clusters in the dermis, perivascular, around the sebaceous gland and the infundibulum (score 4).

Statistical analysis

In all, 252 histological sections were studied. The links between clinical and histological findings are displayed as box-plots, showing the median and the interquartile range. Nonparametric trend tests were carried out using the Jonckheere-Terpstra Test. Descriptive and inferential analyses were performed using SPSS (version 11.0 for Windows; Chicago, Ill.) statistical software.

Results

Clinical parameters, including the presence of PPS and hair density scores, were matched with histological features, including perifollicular infiltrates (PFI) and epidermal thickness.

Clinical features

PPS were commonly found in both males and females with androgenetic alopecia (90% and 86% of subjects, respectively). In males, PPS were significant (score 2 or 3) in 71% and mild (score 1) in 19%. Only two male subjects were totally free of PPS with a hair density score of 2 and 3, respectively. In females, PPS were significant (score 2 and 3) in 57% and mild (score 1) in 29%. Interestingly, PPS were mainly detected in subjects with androgenetic alopecia with hair density scores 4 to 6 (Fig. 3). When de-

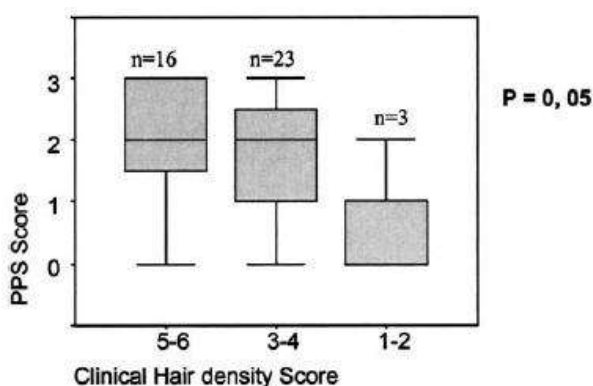


Fig. 3 Statistical analysis of the relationship between clinical hair density and PPS score. The boxes represent values between the 25th and 75th percentile, the horizontal lines are the medians. Note the significant relationship ($P=0.05$) between decrease in PPS score and decrease in hair density score

tected in the vertex area of subjects with androgenetic alopecia, PPS were also detected in non-balding areas, i.e. on the nape, but with a lower intensity. Moreover, a decrease in PPS score was observed together with a decrease in hair density score.

Histological findings

Microscopically, biopsy samples from men and women showed similar pathological changes. All 21 biopsy samples taken from the vertex area of males showed slight to mild dermal oedema, sparse superficial perivascular and interstitial infiltrate of lymphocytes, few mastocytes, and sometimes dilated capillaries in the papillary dermis. No dermal melanocytes could be detected, even close to the infundibulum. A mild mucin deposit (score 1) was observed in the papillary dermis, around the infundibulum, the sebaceous gland and collagenous streamers in 25%, 43%, 14% and 10% of samples from males, respectively. Fibroplasia was noted, characterized by an increased number of fibroblasts and increased amounts of collagen around the sebaceous glands and collagenous streamers [9], in 62% of subjects (Figs. 4, 5 and 6).

All 21 samples taken from females also showed lymphocytic infiltrates with few mastocytes. As observed in male subjects, no dermal melanocytes could be detected. A mild to moderate mucin deposit (score ≤ 2) was observed in the papillary dermis, around the infundibulum, the sebaceous gland and collagenous streamers in 51%, 15%, 35% and 40% of samples from females, respectively. Fibroplasia was detected in 57% of subjects.

The infiltrates were mainly located in the papillary dermis, around the infundibulum, and/or the sebaceous gland (Figs 7 and 8; Table 2). They were not detected in the peri-isthmus area. Occasionally, lymphocytic infiltrates were found in the area of collagenous streamers (in 9% and 43% of male and female samples, respectively). The im-

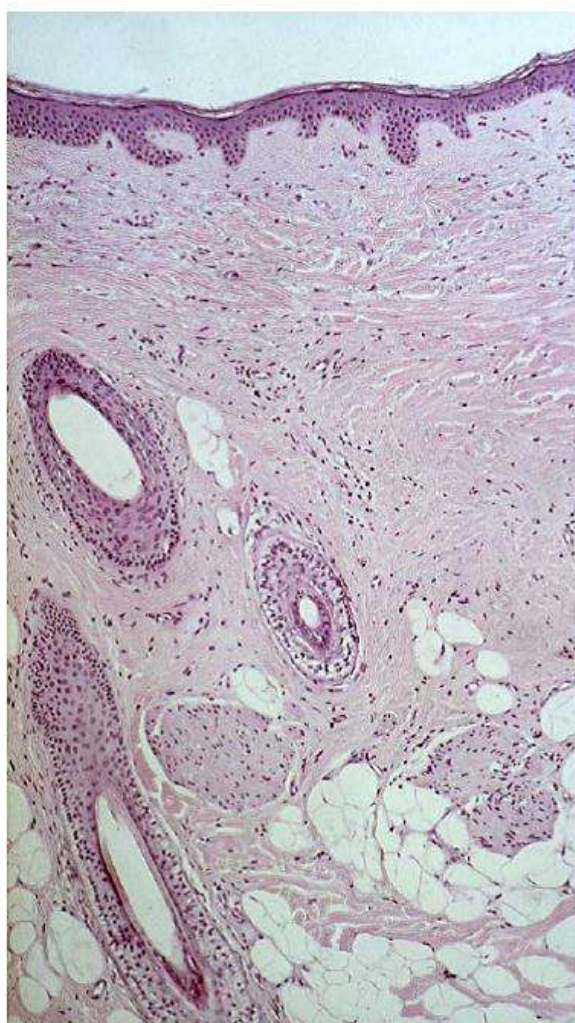


Fig. 4 Scalp pathology in androgenetic alopecia: vertical section. Mild perifollicular fibrosis in the dermis (HE $\times 70$)

munohistochemical study revealed the presence of immunocompetent cells in a distribution similar to that of the infiltrates. An intensity score of ≥ 2 was observed in 47%, 6%, 53% and 68% of samples for CD1a, CD4, CD8 and HLA-DR, respectively (Table 3). These immunohistochemical findings showed that immunocompetent cells were involved in the infiltrates. Moreover, FXIIIa-positive cells, representing a specific population of bone-marrow dermal dendritic cells (dermal dendrocytes) distinct from Langerhans cells, were detected, that shared some features in common with mononuclear phagocytes (monocyte/macrophages) [2]. FXIIIa labelling, with a score ≥ 2 in 84% of the samples studied (Table 3), confirmed the presence of a local infiltrate of immunocompetent cells [2] and suggested the presence of perifollicular fibrosis [18, 19].

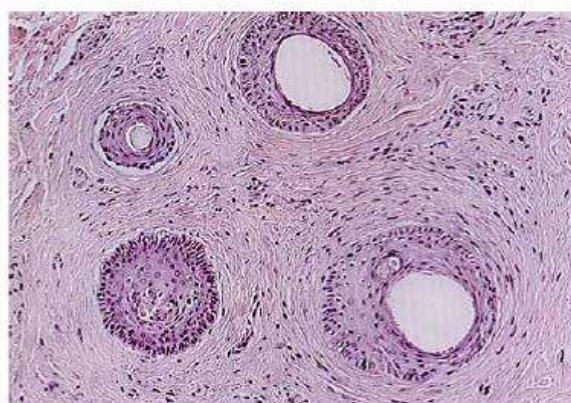


Fig. 5 Scalp pathology in androgenetic alopecia: horizontal section. Moderate peri-infundibular fibrosis (HE $\times 100$)

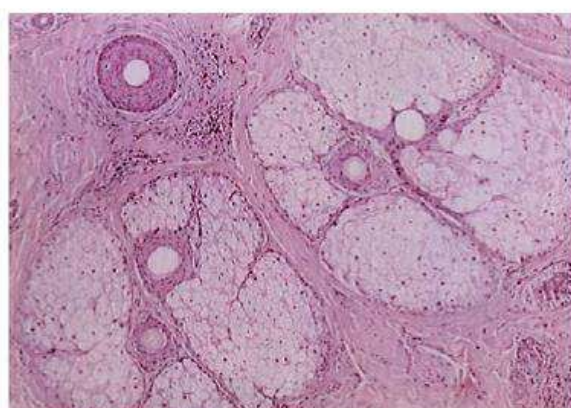


Fig. 6 Scalp pathology in androgenetic alopecia: horizontal section. Follicular units with moderate perifollicular fibrosis around miniaturized follicles (HE $\times 100$)

Histological and clinical relationships

Clinical parameters were compared with quantitative histological parameters. Among the whole population studied, there was a significant relationship between PPS score and global score for PFI ($P < 0.02$; Fig. 9A). In patients with a clinical hair density score exceeding the median value (score 4), a significant increase in PPS score was always associated with an increase in PFI score ($P < 0.01$; Fig. 9B), while no significant link between PPS score and PFI score was found ($P = 0.71$; Fig. 9C) when the clinical hair density score was below the median value (score 4).

A link between epidermal thickness and PPS score among the whole population remained unclear ($P = 0.19$; Fig. 10A). However, in those with a clinical hair density score exceeding the median value (score 4), a significant increase in PPS score was associated with high values of epidermal thickness ($P < 0.01$; Fig. 10B), and in those with a clinical hair density score lower than the median value



Fig. 7 Scalp pathology in androgenetic alopecia: vertical section. Sparse mild superficial perifollicular lymphocytic infiltrate (arrow) (HE $\times 60$)

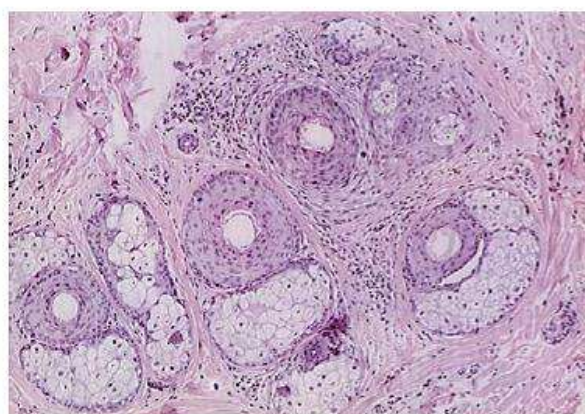


Fig. 8 Scalp pathology in androgenetic alopecia: horizontal section. Severe peri-isthmus and peri-sebaceous lymphocytic infiltrates with perifollicular fibrosis (HE $\times 60$)

(score 4), epidermal thickness did not vary with PPS score (Fig. 10C).

Discussion

Although histopathological changes are often detected in scalp biopsies of both men and women with androgenetic alopecia, the specificity of these findings has frequently been questioned. The presence of PFI has been regarded either as a nonspecific finding by some authors [14], who

Table 2 Scores for inflammatory cells (lymphocyte and few mastocyte infiltrates) (the scores were established on a scale of 0 to 3, see Materials and methods)

	Score	Male samples (%)	Female samples (%)
Papillary dermis	1	24	41
	2	0	45
Peri-infundibulum	1	11	35
	2	0	21
Peri-sebaceous gland	1	10	0
	2	0	26
Peri-isthmus	0	100	100
Dermal sheath	0	100	100
Collagenous streamer	1	9	33
	2	0	10

Table 3 Immunohistological scores (the scores were established on a scale of 0 to 4, see Materials and methods). Values are percent of samples

Score	CD1a	CD4	CD8	HLA-DR	FXIIIa*
0	18	44	3	3	0
1	35	50	44	29	16
2	29	6	44	59	58
3	12	0	9	9	21
4	6	0	0	0	5

*FXIIIa staining was performed on a subset of samples from 19 subjects (11 males with Hamilton grade from I to VI and 8 females with Ludwig grade from I to III)

consider that it is merely related to the normal scalp microflora, or as a pathogenic factor by others, who relate it to the progression of the irreversible process of androgenetic alopecia [9, 13, 17]. Lattanand and Johnson [11] reported the presence of dermal inflammatory infiltrates with variable intensity in 50% of 347 male-pattern alopecia samples studied. Abell [1] found dermal inflammatory infiltrates in 75% of 603 male-pattern baldness patients and local fibrosis in 25%. Whiting recently studied the degree of inflammation in 1017 scalp biopsies from patients with androgenetic alopecia and found mild follicular inflammation in 45% of males and 38% of females, and moderate to dense inflammation in 40% of males and 16% of females [21].

In the present study, PPS were mainly characterized by a brownish halo at the follicular ostium and were widely observed in both male and females with androgenetic alopecia. PPS were mostly found in androgenetic alopecia of subjects with a high hair density score (score 5 or 6), but rarely found when the hair density score was low (score 1 or 2). Links between PPS and melanocytes (absent in the dermis of 100% of the samples studied) and between PPS and mucin deposition (heterogeneously observed throughout the samples) could not be established. However, a link between PPS and the presence of PFI was established. It is believed that PFI is a phenomenon sec-

Fig. 9A–C Statistical analysis of the relationship between PFI score and PPS score. The *boxes* represent values between the 25th and 75th percentile, the *horizontal lines* are the medians. *Circles* are values more than 1.5 box-lengths away from the 75th or 25th percentile. **A** Whole population regardless of hair density score. **B** Hair density scores >4 . **C** Hair density scores <4 . Note the significant link ($P<0.01$) between PPS and PFI scores for hair density scores >4 .

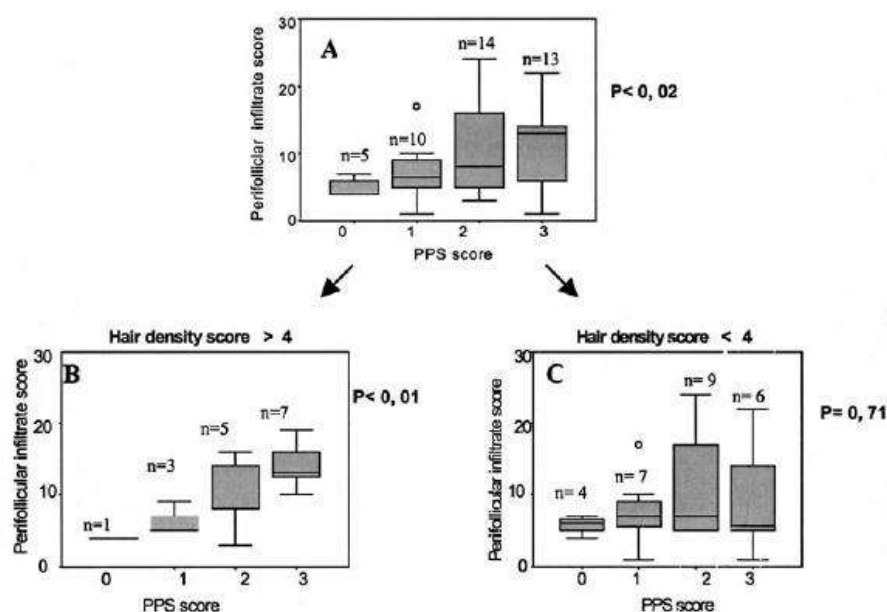
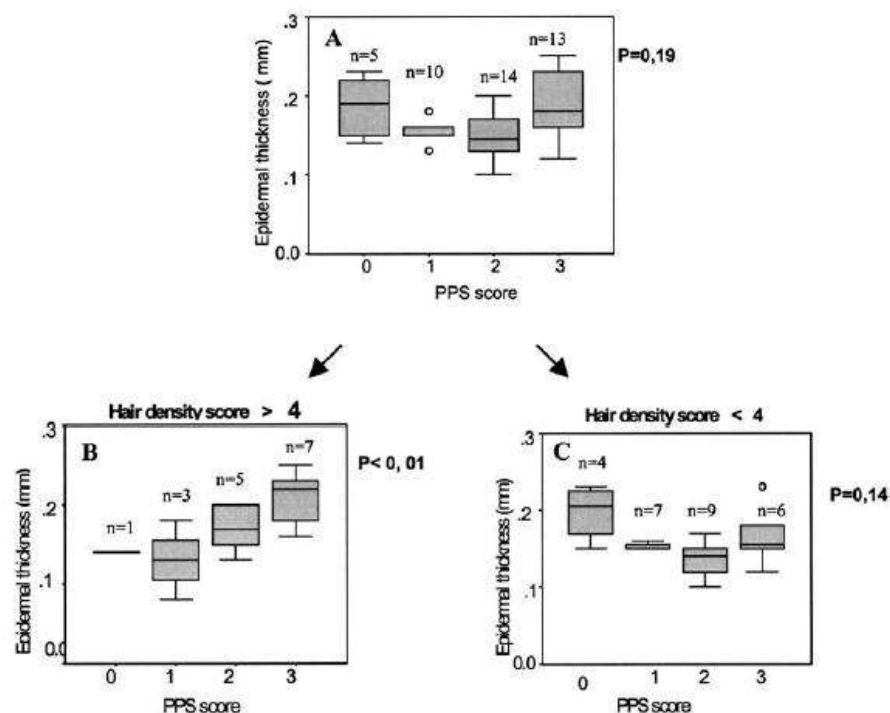


Fig. 10A–C Statistical analysis of the relationship between epidermal thickness and PPS score. The *boxes* represent values between the 25th and 75th percentile, the *horizontal lines* are the medians. *Circles* are values more than 1.5 box-lengths away from the 75th or 25th percentile. **A** Whole population regardless of hair density score. **B** Hair density scores >4 . **C** Hair density scores <4 . Note the significant link ($P<0.01$) between epidermal thickness and PPS scores for hair density scores >4 .



ondary to the balding process rather than a cause of it. The causes may be the use of various cosmetics and other chemicals to treat the balding [20] or the extra exposure of the balding scalp to damaging ultraviolet light [22]. However, in the present study, PPS and PFI were observed in volunteers with a hair density score above 4. Both PPS and PFI therefore appear to be early signs of androgenetic

alopecia, ruling out a possible effect of extra exposure to ultraviolet light, for example.

The close association between PFI and early stages of androgenetic alopecia might explain why such a link has been found in some studies [15]. In our study, PFI was a common feature, not only in male androgenetic alopecia [9, 17], but also in female androgenetic alopecia. The in-

filtrates were mainly composed of lymphocytes with few mastocytes and were located around the infundibulum, isthmus and sebaceous gland, but they were also found in the lower follicle, i.e. in the collagenous streamer. In most reported studies the infiltrates have been found to be composed of mononuclear cells, lymphocytes and histiocytes [7, 9, 10, 19] and to be mainly located around the infundibulum and the isthmus. When present, a lower follicular infiltrate is usually accompanied by an upper follicular infiltrate [5, 9, 10, 11]. Moreover, a conspicuous histological feature has been described as clusters of abnormal inflamed streamers [10] extending down to the subcutis below miniaturized follicles.

PPS appeared as an early detectable characteristic of the onset of androgenetic alopecia. These clinical signs led us to speculate that they could reflect perifollicular disorders directly involved in the hair loss process during its early stages. It is very important to note that global PPS severity was linked to PFI, and the PFI score was more severe when the hair density score was above the median value. In addition, for the highest value of PFI score, an increase in scalp epidermal thickness was noted. This epidermal thickening might be linked to epidermal changes in response to dermal infiltration.

The origin of PPS is not clear, even though the link with mucin deposition or melanocytes can be ruled out. It could be linked to epidermal thickness and/or fibrosis, but additional investigations are needed to detect all histological patterns linked to these new clinical signs, as well to their specificity with respect to androgenetic alopecia. Detection of PPS could be a substantial help in the diagnosis and management of androgenetic alopecia, as a rapid macro-photograph of the scalp could represent a first and easy clinical approach. Moreover, the new clinical perifollicular signs described above as being associated with androgenetic alopecia could contribute to a better knowledge of the microsemiology of androgenetic alopecia.

References

1. Abell E (1988) Histologic response to topically applied minoxidil in male-pattern alopecia. *Clin Dermatol* 6:191–194
2. Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT (1989) Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* 121:421–431
3. Commo S, Bernard BA (1997) Immunohistochemical analysis of tissue remodelling during the anagen-catagen transition of the human hair follicle. *Br J Dermatol* 137:31–38
4. De Lacharrière O, Deloche C, Bastien P, Tardy I, Galan P, Hercberg S (2001) Perifollicular signs during male androgenic alopecia. Evolution risk factors for androgenic alopecia. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15s:134
5. De Lacharrière O, Deloche C, Misciali C, Piraccini BM, Vincenzi C, Bastien P, Tardy I, Bernard BA, Tosti A (2001) Hair diameter diversity. A clinical sign reflecting the follicle miniaturization. *Arch Dermatol* 137:641–645
6. Hamilton JB (1951) Patterned loss of hair in man: types and incidence. *Ann N Y Acad Sci* 53:708–728
7. Headington JT (1984) Transverse microscopic anatomy of the human scalp. A basis for a morphometric approach to disorders of the hair follicle. *Arch Dermatol* 120:449–456
8. Hercberg S, Preziosi P, Briançon S, Galan P, Triol I, Malvy D, Roussel AM, Favier A (1998) A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SU.VI.MAX study – design, methods, and participant characteristics. *Control Clin Trials* 19:336–351
9. Jaworsky C, Kligman AM, Murphy GF (1992) Characterization of inflammatory infiltrates in male pattern alopecia: applications for pathogenesis. *Br J Dermatol* 127:239–246
10. Kligman AM (1988) The comparative histopathology of male-pattern baldness and senescent baldness. *Clin Dermatol* 6:108–118
11. Lattanand A, Johnson WC (1995) Male pattern alopecia: a histopathologic and histochemical study. *J Cutan Pathol* 2:58–70
12. Ludwig E (1977) Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in female sex. *Br J Dermatol* 97:247–254
13. Mahe YF, Michelet JF, Billoni N, Jarrousse F, Buan B, Commo S, Saint-Léger D, Bernard BA (2000) Androgenetic alopecia and microinflammation. *Int J Dermatol* 39:576–584
14. Schreck-Purola I, Lindroos B, Nordström R, Setälä K (1981) Hair neogenesis in man: a histoquantitative study based on 1000 scalp biopsies. In: Orfanos CE, Montagna W, Stüttgen G (eds) *Hair research. Status and future aspects*. Springer-Verlag, New York, pp 344–349
15. Solomon AR (1992) Alopecia by a different name: a matter of splitting hairs. *Arch Dermatol* 128:102–103
16. Sperling LC, Winton GB (1990) The transverse anatomy of androgenetic alopecia. *J Dermatol Surg Oncol* 16:1127–1133
17. Sueki H, Stoudemayer T, Kligman AM, Murphy GF (1999) Quantitative and ultrastructural analysis of inflammatory infiltrates in male pattern alopecia. *Acta Derm Venereol* 79:347–350
18. Toida M, Watanabe F, Tsai CS, Okutomi T, Tatematsu N, Oka N (1989) Factor XIIIa-containing cells and fibrosis in oral and maxillofacial lesions: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 68:293–299
19. Toida M, Okumura Y, Takami T (1991) Cells containing factor XIIIa and pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *J Clin Pathol* 44:255–256
20. Whiting DA (1993) Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 28:755–763
21. Whiting DA (2002) Inflammation and hair loss. 20th World Congress of Dermatology, Paris, 1–5 July
22. Young JW, Conte ET, Leavitt ML, Nafz MA, Schroeter AL (1991) Cutaneous immunopathology of androgenetic alopecia. *J Am Osteopath Assoc* 91:765–771

Claire DELOCHE¹
Philippe BASTIEN¹
Stéphanie CHADOUTAUD¹
Pilar GALAN²
Sandrine BERTRAIS²
Serge HERCBERG²
Olivier DE LACHARRIÈRE¹

¹ L'Oréal Recherche, Clichy, France
² U557 Inserm (UMR
INSERM/INRA/CNAM),
5 rue du Vertbois, Paris, 75003 France

Reprints: O. de Lacharrière
<odelacharriere@rd.loreal.com>
Fax: (+33)1 47 56 82 21

Article accepted on 6/6/2007

Low iron stores: a risk factor for excessive hair loss in non-menopausal women

Iron deficiency has been suspected to represent one of the possible causes of excessive hair loss in women. The aim of our study was to assess this relationship in a very large population of 5110 women aged between 35 and 60 years. Hair loss was evaluated using a standardized questionnaire sent to all volunteers. The iron status was assessed by a serum ferritin assay carried out in each volunteer. Multivariate analysis allowed us to identify three categories: "absence of hair loss" (43%), "moderate hair loss" (48%) and "excessive hair loss" (9%). Among the women affected by excessive hair loss, a larger proportion of women (59%) had low iron stores (< 40 µg/L) compared to the remainder of the population (48%). Analysis of variance and logistic regression show that a low iron store represents a risk factor for hair loss in non-menopausal women.

Key words: hair loss, non-menopausal women, serum ferritin

Hair loss in women is a common trait and the prevalence is age dependent [1]. When a woman consults a dermatologist about hair loss, her condition may or may not lead to alopecia, defined as a decrease in hair density. Patterned androgenic alopecia occurs in 37% of post-menopausal women [2] but only in 10-13% of non-menopausal women [2, 3]. Another hair trouble in non-menopausal women is increased hair loss or hair shedding, also known as chronic telogen effluvium (CTE) [3], affecting around 30% of women in the USA, UK and Japan [4]. Both diffuse androgen-dependent alopecia and chronic telogen effluvium are a major concern in dermatology [5]. However, it is important to remember that in clinical practice, women's complaint of hair loss is still unclear or controversial [6, 7]; other causes must be taken into consideration.

Iron deficiency has been suspected to represent one of the possible causes of excessive hair loss in women. Iron deficiency has been reported to be associated with chronic diffuse hair loss [5, 6, 8, 9]. A total iron depletion was observed when the serum ferritin was below 15 µg/L, and low iron stores with serum ferritin was between 15 and 30 µg/L [10]; Rushton [11] reported that the critical threshold of serum ferritin was 40 µg/L, a level under which increased telogen hair shedding was observed. So far, a direct relationship between ferritin levels and hair loss has not been confirmed by other studies [12, 13] and is still a matter of debate [14-16]. Some evidence was provided in a recent report [17] that decreased serum ferritin is associated with hair loss or alopecia in women; however, several parameters in this study, such as sample sizes, the ferritin thresholds and the clinical features [16, 17] need further explanation.

To further investigate the relationship between iron store and hair loss, we decided to explore this relationship by assessing hair loss and measuring serum ferritin concentration, which is closely related to iron stores [10], in a very

large sample of subjects by taking the advantage of the SU.VI.MAX epidemiological study, which provided us with the opportunity to study, for the first time, a large cohort of 5110 women. The aim of the study was to evaluate a possible link between iron stores based on the assessed ferritin level, and hair loss in women.

Materials and methods

Volunteers

5110 women aged between 35 and 60 years were involved in the study. This cohort of volunteers was part of the SU.VI.MAX trial, a large French epidemiological study [18, 19] approved by the ethical Committee of Paris-Cochin. SU.VI.MAX, which stood for "Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants", was a randomized double blind, placebo-controlled, primary-prevention trial designed to test the efficiency of daily supplementation with anti-oxidant, vitamins and minerals at nutritional doses, in reducing the incidence of cancers and ischemic vascular diseases in a middle-age general population. Detailed description of the SU.VI.MAX study-design, randomization and participant characteristics have been previously reported [18, 19].

Hair loss assessment

Hair loss was assessed with the help of a set of descriptive questions extracted from a self-assessment questionnaire which had been sent to all volunteers at inclusion in the study (table 1). The quantification of hair loss was estimated by quantification of the hairs lost during washing, brushing, after drying with a towel, on the pillow after a night's sleep and on clothes. Hairs that shed were quantified as none or a little, a few and a lot of hairs. Questions concerning the degree of self-perceived hair loss were also

Table 1. Hair loss questionnaire

• Do you feel involved by hair loss?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
• If you feel involved by hair loss, do you estimate that your hair loss corresponds to a transient hair loss?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
• do you estimate that your hair loss corresponds to a persistent hair loss?	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No
• Currently, during hair washing, how much do you estimate your hair loss?	<input type="checkbox"/> Many hairs	<input type="checkbox"/> Few hairs <input type="checkbox"/> Very few or None
• Currently, drying your hair with a bath towel, how much do you estimate your hair loss?	<input type="checkbox"/> Many hairs	<input type="checkbox"/> Few hairs <input type="checkbox"/> Very few or None
• Currently, during hair brushing, how much do you estimate your hair loss?	<input type="checkbox"/> Many hairs	<input type="checkbox"/> Few hairs <input type="checkbox"/> Very few or None
• Currently, after a night sleep, how much do you estimate your hair loss on the pillow?	<input type="checkbox"/> Many hairs	<input type="checkbox"/> Few hairs <input type="checkbox"/> Very few or None
• Currently, during a day how much do you estimate your hair loss on your clothes?	<input type="checkbox"/> Many hairs	<input type="checkbox"/> Few hairs <input type="checkbox"/> Very few or None

provided to establish if the volunteers consider themselves to be concerned by hair loss (non existent, normal, abnormal) and were included in the data analysis. Multiple correspondence analysis and hierarchical cluster analysis (HCA) [20] were used to group the answers with similar expression patterns. This allowed us to identify three distinct groups of volunteers characterized by “absence of hair loss”, “moderate hair loss” and “excessive hair loss” (table 2).

Biochemical measurements

The iron status was assessed by measuring the serum ferritin level and haemoglobin levels in each volunteer. At entry in the study, a 35 mL venous blood sample was collected. After collection (Becton Dickinson tubes), haemoglobin was measured immediately (cyanmethemoglobin method) and kept at +4 °C in the dark until centrifugation and preparation of the aliquots. Serum ferritin levels were measured using a nephelometric assay (BNII Berhing) [21].

Statistical analysis

Descriptive and inferential analyses were performed using SPSS 11.0, SPAD 5.1 and SAS 8.2 statistical softwares. The detection limit of the serum ferritin assay caused some departure from normality even for log-transformed data. Therefore analyses based on ranks have been preferred. Analysis of variance (ANOVA) of serum ferritin level based on ranks has been carried out independently in post-menopausal and non-menopausal women, taking into account the age factors, “hemoglobin” and “hair loss classes” (table 2). For non-menopausal women, the use of intra-uterine devices or contraceptives was also taken into con-

sideration. Comparisons of mean ranked serum ferritin levels relative to the hair loss classes were carried out using the Tukey-Kramer procedure for pairwise comparisons [22]. The relationship between the hair loss classes and serum ferritin levels were fitted using generalized logits [23] controlled for age, haemoglobin, and contraceptives or intra-uterine devices. The “excessive hair loss” class was chosen as the reference class; the significance level was set up at 0.05.

Results

Hair loss quantification

Based on the questionnaire, hierarchical cluster analysis (HCA) using Ward’s criteria clearly identified three well-defined classes of women [20]. The planar projection of individuals (figure 1) displays the three clusters on the first factorial plan. The clusters are stretched along the first component, corresponding to an intensity hair loss axis. The U-shape representation of the clusters is characteristic of a Guttman effect [20] which opposes the classes “absence of hair loss” and “excessive hair loss” classes to “moderate hair loss” class on the second factorial axis. The three classes were characterized using modalities over-expressed in respect to the whole population (table 2). The ellipsoids displays the classes “absence of hair loss”, “moderate hair loss”, and “excessive hair loss” which correspond to 43%, 48%, and 9% of the 5110 women, respectively. Each point on this figure corresponds to a particular profile and is sized proportionally to the frequency of the profile in the studied population.

Table 2. Hair loss classification according to descriptive questions on hair loss signs and hierarchical cluster analysis

Cluster 1 “Absence of Hair Loss”	Cluster 2 “Moderate Hair Loss”	Cluster 3 “Excessive Hair Loss
“not concerned by hair loss”	“hair loss self-perceived as normal hair loss”	“hair loss self-perceived as abnormal hair loss”
“no hair loss or a little during the washing”	“lose a few hairs during the washing”	“lose a lot of hairs during the washing”
“no hair loss or a little during hair brushing”	“lose a few hairs during hair brushing”	“lose a lot of hairs during hair brushing”
“no hair loss or a little on the bath towel”	“lose a few hairs on the bath towel”	“lose a lot of hairs on the bath towel”
“no hair loss or a little on the pillow”		“lose a few or a lot of hairs on the pillow”
“no hair loss or a little on the clothes”		“lose a few or a lot of hairs on the clothes”

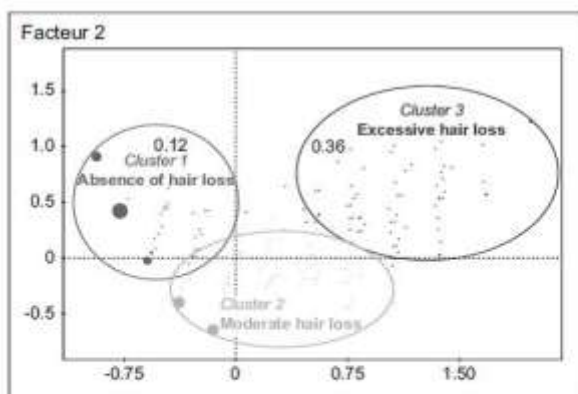


Figure 1. Diagram representing the 3 classes of Non-Menopausal Women according to their hair loss data: *absence of hair loss*: 43%, *moderate hair loss*: 48%, *excessive hair loss*: 9%. This representation is obtained by Principal Component Analysis; it corresponds to the projection of the individuals in the mathematical space done by the variables. The classes ("clusters") are represented here on the factorial plan defined by the first two principal components (*The abscissa axis represents "the first Principal Component" and the ordinate axis represents the "second Principal Component"*).

Link between hair loss and serum ferritin levels

In non-menopausal women, 41.5%, 48.6% and 10% displayed *absence*, *moderate* and *excessive hair loss*, respectively (table 3A). Among them, 23% (881/3759) presented iron depleted stores (serum ferritin levels < 15 µg/L). In addition, 57% [(881+1269)/3759] of non-menopausal women presented low iron stores (serum ferritin < 40 µg/L) (table 3A, figure 2).

In post-menopausal women, the iron loss caused by bleeding during menstruation does not occur anymore. Among them, 47.4%, 46% and 6.6% display *absence*, *moderate* and *excessive hair loss* respectively (table 3B). At that time, only 5% (67/1351) had depleted iron stores (serum ferritin < 15 µg/L) (table 3B). Similarly, the low iron stores

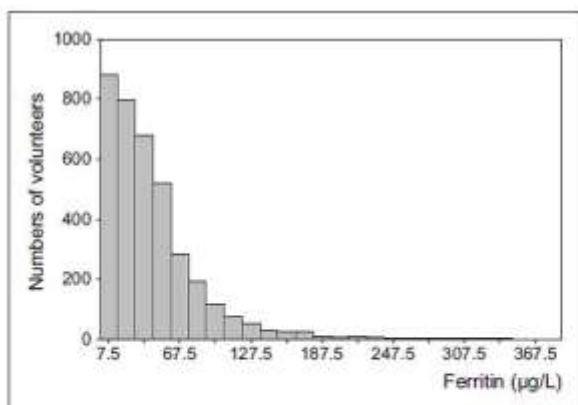


Figure 2. Distribution frequency of Non-Menopausal Women as a function of serum ferritin levels (µg/L) (n = 3759). Note that women with serum ferritin levels ≤ 15 µg/L and ≤ 40 µg/L represent 23% and 57% respectively, of total non-menopausal population.

(serum ferritin < 40 µg/L) affected only 23% [(67+243)/1351] of post-menopausal women *versus* 57% of non-menopausal women.

The detection limit of the serum ferritin assay caused some deviation from normality, even for log-transformed data. Since the parametric analyses could thus be biased, we decided to perform analyse based on ranks. The ANOVA based on ranks showed a significant effect of the mean serum ferritin level on hair loss ($p = 0.01$) only in non-menopausal women. The Tukey-Kramer test for pairwise comparisons showed significant differences between *excessive hair loss* and both *absence* ($p = 0.01$) and *moderate* ($p = 0.02$) hair loss (figure 3).

In non-menopausal women, with serum ferritin levels below 40 µg/L or below 15 µg/L, *excessive hair loss* was significantly more frequent (11.4% [(90+156)/(881+1269)] and 10.2%, respectively), compared to women with optimal levels of ferritin, above 70 µg/L (6.8%) (table 3A). Anemia (defined as hemoglobin < 120 g/L) concerned 10% [(173+43)/(881+1269)] and 19.6% of women presenting a serum ferritin level lower than 40 µg/L or 15 µg/L, respectively. With a serum ferritin level above 40 µg/L, only 1.8% [(23+7)/(937+672)] of the women showed anemia (table 4). Thus, a relationship between hair loss and anemia was noticed only when the body's iron stores was below 40 µg/L.

Adjusted for age, haemoglobin, and the use of contraceptives or intra-uterine devices [21], generalized logits based on ranks for the *absence* versus *excessive hair loss* and *moderate* versus *excessive hair loss* were performed. A generalized logits model was preferred over a conventional polytomous logistic regression, since the assumption of proportional odds was rejected (score test for the proportional assumption, $p = 0.009$). The results showed that low serum ferritin levels appeared to be highly significantly linked to the presence of *excessive hair loss* in non-menopausal women ($p = 0.005$ for *excessive hair loss* versus *absence* of

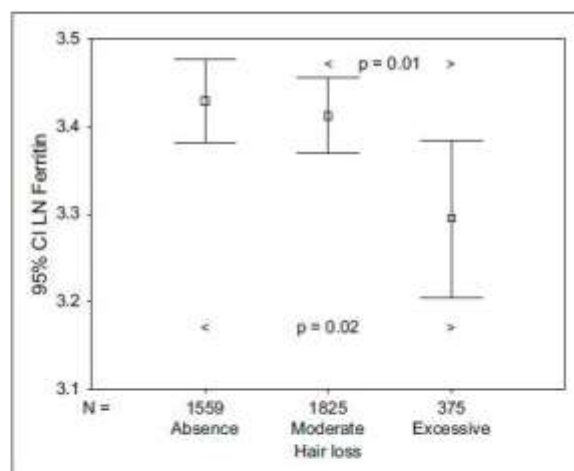


Figure 3. Variation in serum ferritin levels (µg/L) as a function of severity of hair loss in women before menopause (non-menopausal women). Note that Tukey-Kramer test for pair wise comparisons showed significant differences between *excessive hair loss* versus *absence* or *moderate hair loss* classes ($p = 0.02$, $p = 0.01$ respectively). CILN: Confidence Interval of Log_N.

Table 3A. Impact of iron store levels on hair loss status in non-menopausal women (n = 3759)

Ferritin ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Hair loss			Total
		Absence of hair loss	Moderate hair loss	Excessive hair loss	
< 15	Count	365	426	90	881
	% within ferritin	41.4%	48.4%	10.2%	100.0%
[15-40]	Count	512	601	156	1269
	% within ferritin	40.3%	47.4%	12.3%	100.0%
[40-70]	Count	385	469	83	937
	% within ferritin	41.1%	50.1%	8.9%	100.0%
≥ 70	Count	297	329	46	672
	% within ferritin	44.2%	49.0%	6.8%	100.0%
Total	Count	1559	1825	375	3759
	% within ferritin	41.5%	48.6%	10.0%	100.0%

Table 3B. Impact of iron store levels on hair loss status in post-menopausal women (n = 1351)

Ferritin ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Hair loss			Total
		Absence of hair loss	Moderate hair loss	Excessive hair loss	
< 15	Count	30	30	7	67
	% within ferritin	44.8%	44.8%	10.4%	100.0%
[15-40]	Count	106	117	20	243
	% within ferritin	43.6%	48.1%	8.2%	100.0%
[40-70]	Count	175	142	21	338
	% within ferritin	51.8%	42.0%	6.2%	100.0%
≥ 70	Count	330	332	41	703
	% within ferritin	46.9%	47.2%	5.8%	100.0%
Total	Count	641	621	89	1351
	% within ferritin	47.4%	46.0%	6.6%	100.0%

hair loss; $p = 0.005$ for *excessive hair loss* versus *moderate hair loss*). Model adequacy was supported by Hosmer and Lemeshow Goodness-of-Fit test [23]. In addition, the model based on the log transformed ferritin data (figure 4) shows similar results.

Table 4. Impact of iron store levels on hemoglobin level in non-menopausal women (n = 3759)

Ferritin ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Hemoglobin		Total
		< 120 g/L	≥ 120 g/L	
< 15	number	173	708	881
	%	19.6%	80.4%	100.0%
[15-40]	number	43	1226	1269
	%	3.4%	96.6%	100.0%
[40-70]	number	23	914	937
	%	2.5%	97.5%	100.0%
≥ 70	number	7	665	672
	%	1.0%	99.0%	100.0%
Total	number	246	3513	3759
	%	6.5%	93.5%	100.0%

Discussion

This study, carried out for the first time on a very large cohort of women, provides strong arguments in favor of an association between depleted iron stores and hair loss, particularly excessive hair loss in women before menopause. It is likely that women classified in the present study under “*excessive hair loss*” were mainly women with androgenetic alopecia [17], however considering their large number, women with CTE [3] might also be included. Since serum ferritin measurement has been reported to be the most sensitive assay for estimating the iron status in an adult population [24], we used this assay to verify a possible link between iron status and hair loss. Our results fully agreed with previous reports [5, 6, 8, 9] and provide further evidence that the iron status has to be taken into consideration when studying hair loss in women [5] and contrasts with some previous studies where no link between iron deficiency and hair loss was detected. This discrepancy could be explained by differences in the design of the studies. None of the previous studies was performed on an important sample of the general population nor did they take into consideration parameters such as age and haemoglobin concentration in post-menopausal women,

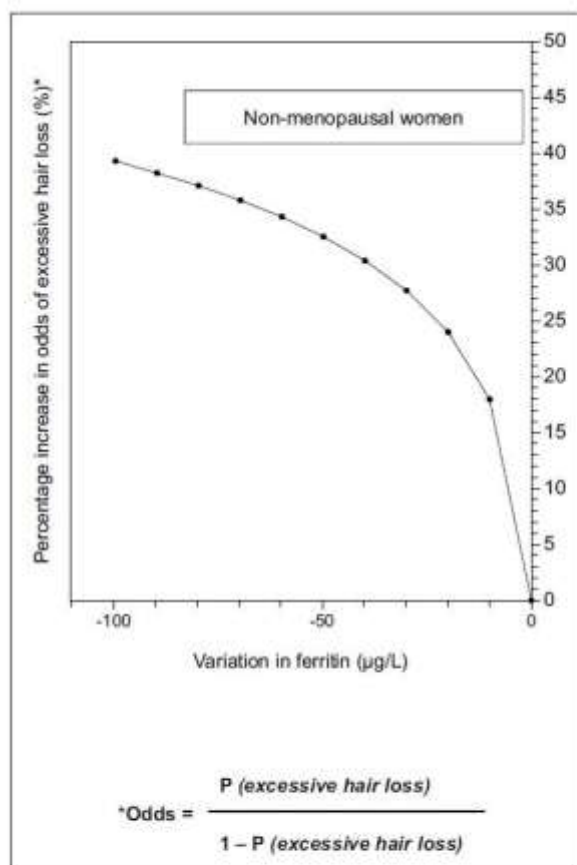


Figure 4. Logistic regression model describing the percentage variation in odds of excessive hair loss [(Probability of excessive hair loss) / 1-(Probability of excessive hair loss)] as a function of the variation of serum ferritin level. Note that it is adjusted for age, hemoglobin, and use of contraceptives or intra-uterine devices.

and also neglecting the adjustment of the results with the use of contraceptives or intra-uterine devices in non-menopausal women. It is known that menstruating women using intra-uterine devices have significantly lower serum ferritin levels than those without contraception, or using oral contraception [21]. A potential weakness of our study, based on the way the data on hair loss were collected, was compensated by the successful logistic regression model, establishing a link between serum ferritin level and excessive hair loss in non-menopausal women.

According to these results, a decrease in ferritin levels might be considered as a potential risk factor for excessive hair loss. For example, a decrease in 30 units of serum ferritin level in non-menopausal women presenting an initial serum ferritin concentration of 70 µg/L (reference mean value of serum ferritin) would lead to a 28% increase in the odds of excessive hair loss.

Our results support the "threshold hypothesis" [17], which states that decreased iron stores lower the threshold for developing different types of alopecia. Nevertheless, additional studies are required to better understand the biological significance of the critical iron status level of 40 µg/L in the etiology of hair loss.

In hair follicles, iron is implicated as a metabolic factor. Iron is also a main constituent for hemoglobin, and iron depletion leads to anemia. The present study indicates that anemia appears for a ferritin threshold much lower than for hair loss. Consequently in clinical practice, an excessive hair loss supports the need to check serum ferritin levels. The optimum serum ferritin levels to reach for effectiveness on hair loss are higher than those usually recommended for treatment of anemia. ■

Acknowledgements. We would like to thank Mrs M. Cartron for her help, Mrs A. Bielicki for her technical assistance, Pr A.M. Roussel (Joseph-Fourier University), Drs P. Preziosi (U557-Inserm), B.A. Bernard and C. Bouillon for critical comments of the manuscript. Disclosure: The authors attest that they have no conflicts of interest to disclose.

References

1. Birch MP, Messenger JF, Messenger AG. Hair density, hair diameter and the prevalence of female pattern hair loss. *Br J Dermatol* 2001; 144: 297-304.
2. Venning VA, Dawber RP. Patterned androgenic alopecia in women. *J Am Acad Dermatol* 1998; 18: 1073-7.
3. Rushton DH, Norris MJ, Dover R, Busuttill N. Causes of hair loss and the developments in hair rejuvenation. *Int J cosm Sci* 2002; 24: 17-23.
4. Rushton DH. Nutritional factors and hair loss. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 396-404.
5. Rushton DH. Management of hair loss in women. *Dermatol Clin* 1993; 11: 47-53.
6. Rushton DH, Ramsay ID, James KC, Norris MJ, Gilkes JH. Biochemical and trichological characterization of diffuse alopecia in women. *Br J Dermatol* 1990; 123: 187-97.
7. Futterweit MD, Dunaif A, Yeh H-C, et al. The prevalence of hyperandrogenism in 109 consecutive female patients with diffuse alopecia. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 831-6.
8. Roberts JL. Examining the etiology of telogen effluvium in pre-and postmenopausal women: a chart review study. Tokyo, Japan: Proceedings, Tri-continental hair research Meeting, 2001; (Poster 157).
9. Haycox C. The incidence of depleted iron stores in North American females presenting with hair loss. Tokyo, Japan: Proceedings, Tri-Continental hair research Meeting, 2001; (Poster 159).
10. Milman N, Kirchhoff M. Iron stores in 1359, 30-to 60-year old Danish women: evaluation by serum ferritin and hemoglobin. *Ann Hematol* 1992; 64: 22-7.
11. Rushton DH, Ramsay ID. The importance of adequate serum ferritin levels during oral cyproterone acetate and ethinyl oestradiol treatment of diffuse androgen-dependent alopecia in women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992; 36: 421-7.
12. Aydingöz IE, Ferhanoglu B, Guney O. Does tissue iron status have a role in female alopecia? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999; 13: 65-7.
13. Averbach R. Low iron levels. *Arch Dermatol* 1968; 98: 681.
14. Sinclair R. There is no clear association between low serum ferritin and chronic diffuse telogen hair loss. *Br J Dermatol* 2002; 147: 982-4.
15. Chamberlain AJ, Dawber RPR. Significance of iron status in hair loss in women. *Br J Dermatol* 2003; 149: 428.
16. Rushton DH, Dover R, Norris MJ. Is there really no clear association between low serum ferritin and chronic diffuse telogen hair loss? *Br J Dermatol* 2003; 148: 1282-4.
17. Kantor J, Kessler LJ, Brooks DG, Cotsarelis G. Decreased serum ferritin is associated with alopecia in women. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 985-8.
18. Hercberg S, Preziosi P, Briançon S, et al. A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SU. VI. MAX study-design, methods, and participant characteristics. *Control Clin Trials* 1998; 19: 336-51.

19. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, Roussel AM, Favier A, Briançon S. The SU.VI.MAX study: a randomized, placebo controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2335-42.
20. Lebart L, Morineau A, Piron M. In: *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Paris: Dunod, 1995: 93-176.
21. Galan P, Yoon HC, Preziosi P, et al. Determining factors in the iron status of adult women in the Suvimax women. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52: 383-8.
22. Westfall PH, Tobias RD, Rom D, et al. In: *Multiple comparisons and multiple tests using the SAS system*. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1999: 73-6.
23. Stokes ME, Davis CS, Koch GG. In: *Categorical data analysis using the SAS system*. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2000: 211-70.
24. Hercberg S, Galan P. Nutritional anaemias. In: Flemming AF, ed. *Clinical Haematology International Practice and Research*. Baillière, London: Tindall, 1992: 145-68.

PUBLICATIONS TRAVAUX SCIENTIQUES
ARTICLES PEAU

ANNEXE 4



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 99 (2006) 182–188

The Journal of
Steroid Biochemistry
&
Molecular Biology

www.elsevier.com/locate/jsbmb

Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women

Fernand Labrie^{a,*}, Alain Bélanger^a, Patrick Bélanger^a, René Bérubé^a,
Céline Martel^a, Leonello Cusan^a, José Gomez^a, Bernard Candas^a,
Isabelle Castiel^b, Véronique Chaussade^b,
Claire Deloche^b, Jacques Leclaire^b

^a Laboratory of Molecular Endocrinology and Oncology, Laval University Hospital Research Center (CRCHUL) and Laval University, Québec City, Que., Canada G1V 4G2

^b L'Oréal Recherche, Centre Charles Zviak, 92583 Clichy Cedex, France

Received 25 October 2005; accepted 6 February 2006

Abstract

Despite the long series of cohort studies performed during the last 20 years, the correlation between serum testosterone and any clinical situation believed to be under androgen control in women has remained elusive. This is likely related to the recent finding that the androgens made locally in large amounts in peripheral tissues from the precursor dehydroepiandrosterone (DHEA) act in the same cells where synthesis takes place and are not released in significant amounts in the circulation, thus making unreliable the measurement of serum testosterone as marker of total androgenic activity. The objective is to determine if serum androgen glucuronides can be replaced by testosterone or another steroid as measure of androgenic activity.

Since the glucuronide derivatives of androgens are the obligatory route of elimination of all androgens, these metabolites were measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry under basal conditions in 377 healthy postmenopausal women aged 55–65 years as well as in 47 premenopausal women aged 30–35 years while testosterone was assayed by gas chromatography mass spectrometry. No correlation was found between the serum concentration of testosterone and that of androsterone glucuronide (ADT-G) or androstenediol glucuronide (3 α -diol-G), the androgen metabolites which account for the total pool of androgens.

The present data show that measurement of the total pool of androgens reflected by the serum levels of ADT-G and 3 α -diol-G cannot be replaced by serum testosterone or any other steroid, including DHEA or DHEA sulphate. These findings may have implications for women with androgen deficiency involving osteoporosis, obesity, type 2 diabetes, sexual dysfunction, loss of muscular strength and a series of other clinical situations affecting women's health. Measuring ADT-G and 3 α -diol-G might identify cases of true androgen deficiency and provide an opportunity to offer appropriate androgen therapy.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Testosterone; Androsterone; Glucuronides; Intracrinology; Mass spectrometry; Androgenic activity marker

1. Introduction

It has been a long-lasting problem to realize, report after report, that the long series of case-control and prospective

cohort studies which analyzed the correlation between serum testosterone and the incidence of obesity, insulin resistance, breast cancer, sexual dysfunction or other clinical problems in women always yielded contradictory results (reviewed in Refs. [1–10]). Such a lack of correlation is difficult to reconcile with the well-demonstrated stimulation of sexual function [4,7,9] and the inhibitory effects of exogenous androgens on obesity and breast cancer [1,3,11–13]. This lack of consistency between the serum levels of testosterone and the effect of exogenous androgens has raised serious

* Corresponding author at: Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, Laval University Medical Center (CRCHUL), 2705, Laurier Boulevard, Québec City, Que., Canada G1V 4G2. Tel.: +1 418 654 2704; fax: +1 418 654 2735.

E-mail address: fernand.labrie@crchul.ulaval.ca (F. Labrie).

doubts about the validity of measurements of total as well as free serum testosterone as markers of androgenic activity in women.

One explanation for the lack of correlation between serum testosterone and clinical parameters known to be under androgen control could be related to the recent data showing that the majority of androgens in women are made locally in peripheral target tissues from the inactive precursor dehydroepiandrosterone (DHEA) of adrenal gland origin [1,14,15]. Since the androgens made locally do not originate from circulating testosterone, one could reasonably expect that measurement of the serum levels of testosterone is of questionable biological and clinical significance. In fact, the androgens testosterone and dihydrotestosterone (DHT) made in peripheral tissues from DHEA of adrenal origin exert their action locally in the same cells where synthesis takes place with only minimal release as active androgens in the circulation. Following their formation and availability for local intracellular action, testosterone and DHT are inactivated and transformed in the same cells into water soluble glucuronide derivatives which diffuse quantitatively into the general circulation where they can all be measured before their elimination by the kidneys (Fig. 1). This recently identified mechanism of steroid formation and action has been named intracrinology [14,16].

In addition to the above-identified major issue about the biological significance of the serum testosterone concentration which does not take into account the large amount of androgens made in peripheral tissues, it should be mentioned that the radioimmunoassays generally used to measure serum sex steroids have questionable specificity [17–20].

Considering the major importance for the clinicians and women to have access to a valid and precise marker of andro-

genic activity in order to assess with confidence the role of androgens in a series of problems particularly frequent after menopause, namely type 2 diabetes, obesity and arteriosclerosis (metabolic syndrome), sexual dysfunction, osteoporosis, breast cancer, skin atrophy as well as loss of muscular strength, physical fitness and well-being, we have used liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) to measure nine androgens, their precursors and metabolites in 377 postmenopausal women in good health aged 55–65 years in order to analyze the correlation between serum testosterone and the true markers of the total pool of androgens, namely the glucuronide derivatives of androsterone (ADT) and androstane-3 α , 17 β -diol (3 α -diol), the obligatory route of elimination of androgens. We have also compared with data obtained in 47 normal 30–35-year-old normally cycling women.

2. Subjects

Three hundred and seventy seven (377) healthy postmenopausal women aged 55–65 years and 47 premenopausal 30- to 35-year-old women participated in this study after IRB approval and having given written informed consent. No subject had taken hormone replacement therapy during the previous 6 months. No subject was suffering from an endocrine disorder, and none was under treatment with lipid- or glucose-lowering agents. Subjects did not have active or history of thromboembolic disease, significant metabolic or endocrine disease or clinically significant gastrointestinal, liver or gallbladder disease. There was no migraine and no diabetes mellitus not controlled by conventional therapy. Subjects had no corticosteroid treatment within 6 weeks of study entry as well as treatment with β -carotenoid, retinoic acid, hydroquinone, α -hydroxyacid (including inhaled, topical, oral). Hypertension equal to or above 160/95 mm Hg or not controlled by standard therapy as well as confirmed clinically significant depression or confirmed severe psychiatric disturbance were not permitted.

No administration of any investigational drug within 30 days of screening visit or previous treatment with androgens or anabolic steroids within 6 months prior to the screening visit was permitted. The subjects had no exposure to or use of antidepressants, antipsychotics, narcotic and analgesics, within 30 days prior to enrollment. Smoking any number of cigarettes was an exclusion criteria. There was no former or present narcotic addiction or alcoholism. The body weight ranged between 18.5 and 29.9 of ideal body weight according to body mass index (BMI). No hepatic or renal impairment or condition known to affect drug or steroid metabolism was permitted. All subjects had a medical history, complete physical examination, serum biochemistry as well as complete blood and urinalysis. Blood sampling was performed under fasting conditions between 08:00 and 10:30 h.

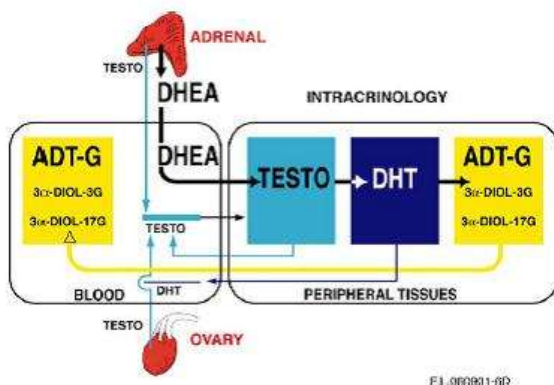


Fig. 1. Schematic representation of the very important contribution of the precursor DHEA of adrenal origin to total androgenic activity in postmenopausal women with a parallel minor contribution of testosterone of two origins, namely the ovary and adrenal. A very small proportion of the testosterone and DHT made intracellularly by the steroidogenic enzymes of the intracrine pathway diffuse into the circulation. The height of the bars is proportional to the concentration of each steroid.

3. Materials and methods

3.1. Quantitation of steroids in human serum: human blood sample collection for measurement of DHEA and related steroids

The serum steroid levels of DHEA, DHEA-S, androst-5-ene-3 β , 17 β -diol (5-diol), dihydrotestosterone (DHT), testosterone, androstenedione (4-dione), androsterone glucuronide (ADT-G), androstane-3 α , 17 β -diol-3-glucuronide (3 α -diol-G) and 3 α -diol-17G were measured at the Laboratory of Molecular Endocrinology, CHUL Research Center.

3.2. Analysis of non-conjugated steroids

3.2.1. Preparation of calibration curve of standard samples

DHEA, 5-diol, 4-dione, testo, and DHT were analyzed by GC-MS. On each day of analysis, calibration standards ranging from 0.2 to 20 ng/mL for DHEA and 5-diol, from 0.05 to 10 ng/mL for 4-dione and testo and from 0.02 to 4 ng/mL for DHT were prepared using charcoal-adsorbed human serum.

3.2.2. Extraction of steroids from human serum

Briefly, 500 μ L of a 0.5 M sodium acetate solution is added to each tube (1.0 mL for calibration standards). A methanolic solution (50 μ L), containing a mixture of deuterated steroid internal standards, was then added to each tube. Aliquots of 0.75 mL of study samples (0.25 mL for calibration standards) were added and tubes were vortexed for ca. 1 min.

1-Chlorobutane (3 mL) was then added to each tube and mixed. After centrifugation, the organic extracts were collected and purified on LC-Si SPE columns. Columns and the adsorbed material were washed with ethyl acetate:hexane (ca. 6 mL; 1:9; v:v). The analytes of interest were then eluted using 4 mL ethyl acetate:hexane (50:50; v:v) which was evaporated at 50 °C. The dried residue was reconstituted in 0.5 mL ethyl acetate and vortexed for ca. 15 s.

An aliquot of 100 μ L was transferred to a glass tube for the assay of 4-dione and the remaining extract was kept in the tube for the assay of DHEA, 5-diol, testo and DHT. Both extracts were evaporated at 50 °C.

3.2.3. Derivatization of DHEA, 5-diol, testo and DHT

Pentafluorobenzoylchloride in ethyl acetate (50 μ L; 1/10; w/v) and pyridine in ethyl acetate (500 μ L; 1/99; v:v) were added to the dried residue of DHEA, 5-diol, testo and DHT and the samples were incubated for ca. 30 min at 60 °C. After evaporation of the reagent mixture, a solution of 0.5 M NaHCO₃ (1.0 mL) was added to the tubes, which were then left to react for 15 min at room temperature. Hexane (2 mL) was then added to the tubes which were vortexed for ca. 2 min and left at room temperature for ca. 10 min. The organic phase was evaporated at 50 °C and the final extract reconstituted in

50 μ L isooctane and then transferred into a conical vial for injection into the GC/MS.

3.2.4. Derivatization of 4-dione

A solution of 1 mg pentafluorobenzylhydroxylamine/mL pyridine (100 μ L) was added to the 4-dione extract and the tubes were incubated for ca. 30 min at 60 °C. After derivatization, the tubes were left to cool at room temperature for ca. 5 min and hexane (3 mL) was added to the samples. The mixtures were vortexed for ca. 5 s and then evaporated at 50 °C. The final extract was reconstituted in 50 μ L isooctane and then transferred into a conical vial for injection into the GC/MS system.

3.2.5. Analysis by GC/MS

The GC/MS system for the analysis of DHEA, 5-diol, 4-dione, testo and DHT uses a 50% phenyl-methyl polysiloxane (DB-17HT) capillary column (30 m \times 0.25 mm internal diameter, 0.15 μ m film thickness) with helium as the carrier gas. The analytes and IS were detected using a HP5973 quadrupole mass spectrometer equipped with a chemical ionization source.

3.3. Analysis of the conjugated steroids—ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G: preparation of calibration curve of standard samples

ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G were analyzed by a LC/MS/MS method using TurboIonSpray. On each day of analysis, calibration standards ranging from 2 to 200 ng/mL for ADT-G and from 0.50 to 50 ng/mL for 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G were prepared using a mixture of charcoal-adsorbed serum:water (1:1;v:v).

3.3.1. Extraction from human serum

Briefly, 500 μ L of serum sample were transferred to each tube. Water (500 μ L) was added and the tubes were then vortexed. A methanolic solution (100 μ L) containing the deuterated steroid internal standard was then added to each tube. A solution of NaH₂PO₄/citric acid buffer (1.5 mL) was added and the tubes were vortexed again.

Samples were transferred to the C-18 SPE columns. Each column was then washed with water and a solution of methanol:water (50:50;v:v). The analytes of interest were then eluted using a solution (4 mL) of methanol:water (80:20;v:v), containing 10 mM ammonium acetate. The eluates were evaporated at 45 °C and the dried residue was reconstituted in a solution (100 μ L) of methanol:water (50:50;v:v) containing 0.01% acetic acid prior to analysis.

3.3.2. Analysis by LC-MS/MS

The HPLC system uses a 150 mm \times 4.6 mm, 4 μ m particle size Synergy Hydro-RP column at a flow rate of 1.0 mL/min. ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G are detected using

a Sciex API 3000 triple quadrupole mass spectrometer, equipped with TurboIonSpray™.

3.4. Analysis of the conjugated steroid DHEA-sulfate (DHEA-S): preparation of calibration curve standard samples

DHEA-S was analyzed by a LC/MS/MS method using Turbolonspray. On each day of analysis, calibration standards ranging from 0.075 to 10 µg/mL were prepared using PBS:charcoal adsorbed serum (1:1;v:v).

3.4.1. Extraction from human serum

Briefly, 100 µL of the serum sample was transferred to individual tubes and 2 mL of PBS buffer was added. A methanolic solution (50 µL) containing the deuterated steroid internal standard was then added to each tube. Samples were transferred on Oasis HLB SPE columns and each column was washed with water and methanol:water (10:90;v:v). The analytes of interest were then eluted with 4 mL of methanol. Methanol was evaporated at 35 °C and the dried residue reconstituted in 125 µL of methanol:water (50:50;v:v) and then filtered on 0.2 µm nylon filter. Part of this solution (20 µL) was diluted in 0.5 mL of methanol:water (50:50;v:v) containing 5 mM ammonium acetate and 0.01% acetic acid for the DHEA-S analysis.

3.4.2. Analysis by LC-MS/MS

For DHEA-S analysis, the HPLC system uses a 100 mm × 3.2 mm, 5 µm particle size, Phenomenex Columbus C18 column at a flow rate of 0.5 mL/min. DHEA-S was detected using a Sciex API 300 or 3000 triple quadrupole mass spectrometer, respectively, equipped with Turbolonspray™. The coefficients of variation of the steroid assays by mass spectrometry are indicated in Table 1.

3.5. Statistical analysis

The distribution characteristics of the serum levels is presented in Table 1 for all measured androgen metabolites. Some values are graphically presented on Figs. 2–5. For the

Table 1

Intra- and inter-assay coefficients of variation (%) for nine steroids measured by GC-MS^X and LC-MS/MS^{XX} in human samples (endogenous steroids)

Steroid	ng/ml	Coefficient variation	
		Within runs	Between runs
DHEA ^X	2.44	2.0	1.9
DHEA-S ^{XX}	593	5.2	6.3
5-diol ^X	0.91	9.5	13.1
4-dione ^X	0.62	3.7	4.2
Testo ^X	0.48	2.9	3.4
DHT ^X	0.11	3.1	4.1
ADT-G ^{XX}	22.8	3.1	3.7
3α-diol-3G ^{XX}	0.79	10.3	10.7
3α-diol-17G ^{XX}	1.65	4.6	5.3

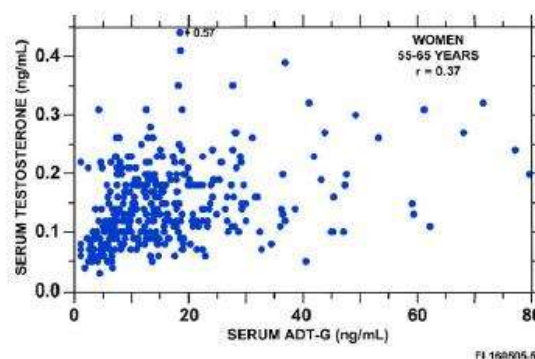


Fig. 2. Lack of correlation between serum ADT-G (androsterone glucuronide) and testosterone concentrations in three hundred seventy-seven (377) 55–65-year-old postmenopausal women. The Spearman correlation coefficient value of 0.37 is indicated.

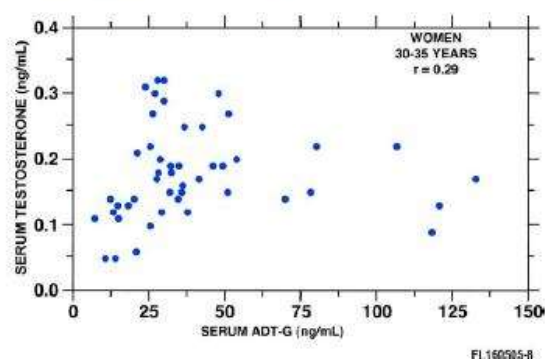


Fig. 3. Lack of correlation between serum testosterone and ADT-G levels in forty-seven (47) 30–35-year-old premenopausal women. The Spearman correlation coefficient value of 0.29 is indicated.

women aged 55–65 years, the distributions of DHEA, 4-dione and testo were fitted to lognormal distributions. However, for 5-diol, DHT, 3α-diol-3G, 3α-diol-17G, DHEA-S and ADT-G, a normal kernel density estimate was used to represent the distribution. For the women aged 30–35 years, distributions

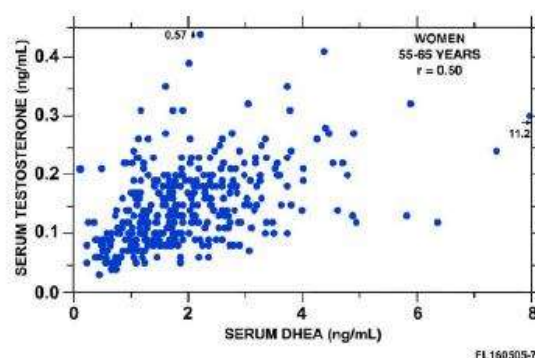


Fig. 4. Lack of correlation between serum testosterone and DHEA levels in three hundred seventy-seven (377) 55–65-year-old postmenopausal women. The Spearman correlation coefficient value of 0.50 is indicated.

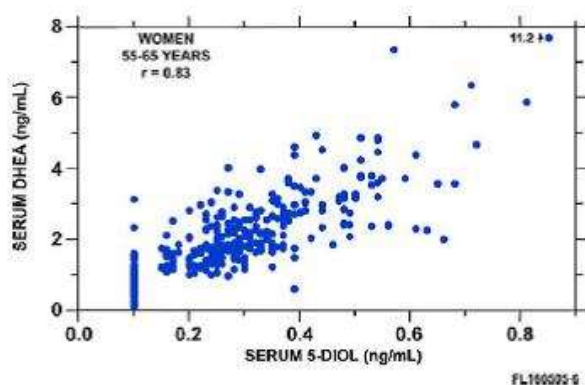


Fig. 5. Correlation between serum DHEA (dehydroepiandrosterone) and 5-diol (androst-5-ene-3 β , 17 β -diol) levels in three hundred seventy seven (377) 55–65-year-old postmenopausal women. The Spearman correlation coefficient value (r) of 0.83 is indicated.

were fitted to lognormal distributions except for 3 α -diol-17G where a normal kernel density estimate was used. The closeness of the relationship between any two circulating androgens was estimated by the Spearman correlation coefficient (Table 2).

4. Results

The serum levels of androgens as well as their precursors and glucuronide derivatives measured by mass spectrometry in 377 healthy postmenopausal women aged 55–65 years are shown in Table 2. For comparison, the values found in normal cycling 30–35-year-old women are shown in the same table.

As can be seen in Fig. 2 and Table 3, no useful correlation is found between serum testosterone and ADT-G ($r=0.37$), this metabolite accounting by itself for 93% of the obligatory metabolites of androgen elimination. An even lower correlation is observed between serum testosterone and the serum levels of the two other androgen glucuronides, namely 3 α -diol-3G (androstane-3 α , 17 β -diol-3G) ($r=0.27$) and 3 α -diol-17G ($r=0.22$) (Table 3). A similar lack of correlation between testosterone and ADT-G ($r=0.29$) is seen in normal cycling 30- to 35-year-old women (Fig. 3). A somewhat better but still poor correlation is observed between serum testosterone and DHEA, the main source of androgens in women, with a r -value of 0.50 (Fig. 4) or between DHEA and ADT-G with a r -value of 0.65 (Table 3).

In fact, testosterone is, among all the steroids measured, the one showing the lowest correlation with the three glucuronide derivatives of androgens. Such data suggest that variable rates of secretion of testosterone by the ovary and/or adrenal could be responsible for the lack of correlation of ADT-G and 3 α -diol-G with serum testosterone which is the sum of testosterone of ovarian and adrenal origins secreted directly into the blood plus the testosterone diffusing from the peripheral tissues following peripheral transformation of DHEA into androgens (Fig. 1). It is also possible that the

Table 2
Serum steroid levels in post-menopausal women aged 55–65 years as well as in normal cycling women aged 30–35 years

Status	Distribution parameter	DHEA (ng/mL)	5-Diol (ng/mL)	4-Dione (ng/mL)	Testo (ng/mL)	DHT (ng/mL)	ADT-G (ng/mL)	3-G (ng/mL) ^a	17G (ng/mL) ^b	DHEA-S (ng/mL)
55–65-year-old postmenopausal women ($n=377$)	Mean	1.96	0.27	0.40	0.14	0.04	15.83	0.64	0.57	0.59
	S.D.	1.18	0.15	0.18	0.070	0.03	12.46	0.52	0.47	0.36
	Median	1.72	0.25	0.37	0.13	0.03	13.11	0.55	0.25	0.55
30–35-year-old premenopausal women ($n=47$)	5th–95th centiles (min–max)	0.56–3.99 (0.1–11.19)	0.1–0.54 (0.1–0.85)	0.17–0.71 (0.1–1.37)	0.06–0.26 (0.03–0.57)	0.01–0.07 (0.01–0.29)	3.27–41.72 (1.0–79.4)	0.25–1.69 (0.25–3.48)	0.25–1.54 (0.25–3.56)	0.15–1.24 (0.04–2.44)
	Mean	4.47	0.49	0.96	0.18	0.07	40.21	1.21	1.43	1.27
	S.D.	2.19	0.20	0.35	0.07	0.03	29.31	0.83	0.93	0.62
5th–95th centiles (min–max)	Mean	4.14	0.44	0.92	0.17	0.07	31.62	1.06	1.35	1.04
	S.D.	1.53–9.14 (1.41–10.37)	0.25–0.84 (0.25–0.96)	0.45–1.64 (0.31–1.77)	0.06–0.31 (0.05–0.32)	0.03–0.14 (0.03–0.17)	12.17–118.2 (6.86–132.6)	0.25–2.78 (0.25–4.33)	0.25–2.56 (0.25–5.71)	0.56–2.65 (0.45–2.71)

^a Androstane-3 α ,17 β -diol-3G.

^b Androstane-3 α ,17 β -diol-17G.

Table 3

Spearman correlation coefficients (*r*) for serum steroid levels in postmenopausal women aged 55–65 years as well as in normal cycling women aged 30–35 years

Status	Steroid								
	DHEA	5-Diol	4-Dione	Testo	DHT	DHEA-S	ADT-G	3G	17G
55–65-year-old postmenopausal women (<i>n</i> = 377)									
DHEA	1.00	0.83	0.79	0.50	0.65	0.77	0.65	0.52	0.47
5-Diol	0.83	1.00	0.61	0.53	0.70	0.77	0.57	0.50	0.46
4-Dione	0.79	0.61	1.00	0.56	0.49	0.52	0.51	0.43	0.39
Testo	0.50	0.53	0.56	1.00	0.56	0.41	0.37	0.27	0.22
DHT	0.65	0.70	0.49	0.56	1.00	0.65	0.59	0.46	0.42
DHEA-S	0.77	0.77	0.52	0.41	0.65	1.00	0.62	0.55	0.45
ADT-G	0.65	0.57	0.51	0.37	0.59	0.62	1.00	0.71	0.59
3G	0.52	0.50	0.43	0.27	0.46	0.55	0.71	1.00	0.63
17G	0.47	0.46	0.39	0.22	0.42	0.45	0.59	0.63	1.00
30–35-year-old premenopausal women (<i>n</i> = 47)									
DHEA	1.00	0.89	0.70	0.46	0.43	0.61	0.55	0.55	0.44
5-Diol	0.89	1.00	0.65	0.62	0.60	0.66	0.46	0.46	0.39
4-Dione	0.70	0.65	1.00	0.73	0.47	0.54	0.44	0.55	0.60
Testo	0.46	0.62	0.73	1.00	0.65	0.44	0.29	0.38	0.45
DHT	0.43	0.60	0.47	0.65	1.00	0.43	0.44	0.35	0.39
DHEA-S	0.61	0.66	0.54	0.44	0.43	1.00	0.47	0.50	0.46
ADT-G	0.55	0.46	0.44	0.29	0.44	0.47	1.00	0.80	0.70
3G	0.55	0.46	0.55	0.38	0.35	0.50	0.80	1.00	0.73
17G	0.44	0.39	0.60	0.45	0.39	0.46	0.70	0.73	1.00

peripheral tissue-made testosterone that diffuses at a low level into the circulation could be highly variable and explain, at least partially, the lack of correlation with serum androgen glucuronides. Better correlations are observed, however, between serum DHEA and its 17 α -reduced metabolite androstenediol (5-diol) ($r=0.83$) (Fig. 5), DHEA and androstenedione ($r=0.79$) as well as between DHEA and its sulphated metabolite DHEA-S ($r=0.77$) (Table 2).

5. Discussion

While one would ideally like to know the level of androgenic activity in each specific tissue, such a direct measurement of the intratissular concentration of the active androgens is not possible in the human except under exceptional circumstances such as in samples of tissue obtained at surgery [21–23]. However, while not permitting the assessment of androgenic activity in specific tissues, measurement of the glucuronide derivatives of ADT and 3 α -diol by validated mass spectrometry techniques permits a precise measure of the total pool of androgens in the whole organism. In fact, it is now well established that uridine glucuronosyl transferase 2 B7 (UGT 2 B7), UGT 2 B15 and UGT 2 B17 are the three enzymes responsible for the glucuronidation of all androgens and their metabolites in the human [24]. This recent completion of the identification and characterization of all the human UDP-glucuronosyl transferases now makes possible the use of the glucuronide derivatives of androgens as markers of the total pool of androgens in both women and men. ADT-S is also a metabolite excreted in large amounts but this steroid is exclusively of adrenal origin

and does not reflect androgenic activity in peripheral tissues [25].

It is thus remarkable that man, in addition to possessing very sophisticated endocrine and paracrine systems, has largely vested in sex steroid formation in peripheral tissues [14–16,22,23]. The level of transformation of the adrenal precursor steroid DHEA into androgens and/or estrogens in peripheral target tissues thus depends upon the level of expression of the various steroidogenic enzymes in each cell of each tissue [1,14]. This situation of a high secretion rate of adrenal precursor sex steroids by the adrenals in men and women is thus completely different from all animal models used in the laboratory, namely rats, mice, guinea pigs, and all others (except monkeys), where the secretion of sex steroids takes place exclusively in the gonads and the adrenals do not secrete significant amounts of DHEA [23].

The classical concept of androgen and estrogen secretion in women assumed that all sex steroids had to be transported by the general circulation following secretion by the ovaries before reaching the target tissues. According to this classical concept, it was erroneously believed that the active steroids could be measured directly in the blood, thus providing a potentially easily accessible measure of the general exposure to sex steroids. In fact, this concept is valid only for the animal species lower than primates but it does not apply to the human, especially in postmenopausal women where all estrogens and almost all androgens are made locally from DHEA in the peripheral tissues which possess the enzymes required to synthesize the physiologically required active sex steroids. Such a local biosynthesis and action of androgens in target tissues eliminates the exposure of other tissues to androgens and thus minimizes the risks of undesirable masculinizing or

other androgen-related side effects [23]. The same applies to estrogens, although a reliable parameter of total estrogen secretion (comparable to the glucuronides identified for androgens) has yet to be determined. Although a fraction of androgens are aromatized to estrogens, the lack of sufficient information on the identity of the metabolites does not permit to make a sufficiently complete analysis of their metabolism at this time.

The present data show that the most practical and probably only valid means of assessing androgenic activity in women is to measure ADT-G, the metabolite that accounts for 93% of the total androgen glucuronide derivatives, by a validated liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique, thus replacing measurement of serum testosterone. This strategy should identify the cases of true androgen deficiency, thus offering the possibility to prescribe an appropriate androgen therapy or prevention regimen.

Acknowledgements

The normal and healthy subjects who provided data for this publication were candidates recruited for various clinical trials run at the Research Centre of Le Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL Research Center). These subjects were at the screening phase and had received no treatment. The funding for the screening of subjects was from Endorecherche and l'Oréal, but the present baseline steroid data have no implication for the endpoints of the trials.

References

- [1] F. Labrie, V. Luu-the, C. Labrie, A. Bélanger, J. Simard, S.-X. Lin, G. Pelletier, Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone, *Endocr. Rev.* 24 (2003) 152–182.
- [2] R. Basson, A new model of female sexual desire, *Endocr. News* 29 (2004) 22.
- [3] A. Tchernof, F. Labrie, Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk. A review of human studies, *Eur. J. Endocr.* 151 (2004) 1–14.
- [4] J.L. Shifren, G.D. Braunstein, J.A. Simon, P.R. Casson, J.E. Buster, G.P. Redmond, R.E. Burki, E.S. Ginsburg, R.C. Rosen, S.R. Leiblum, K.E. Caramelli, N.A. Mazer, Transdermal testosterone treatment in women with impaired sexual function after oophorectomy, *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 682–688.
- [5] B.B. Sherwin, M.M. Gelfand, The role of androgen in the maintenance of sexual functioning in oophorectomized women, *Psychosom. Med.* 49 (1987) 397–409.
- [6] D.R. Cameron, G.D. Braunstein, Androgen replacement therapy in women, *Fertil. Steril.* 82 (2004) 273–289.
- [7] C.F. Garland, N.J. Friedlander, E. Barrett-Connor, K.T. Khaw, Sex hormones and postmenopausal breast cancer: a prospective study in an adult community, *Am. J. Epidemiol.* 135 (1992) 1220–1230.
- [8] S. Leiblum, G. Bachmann, E. Kemmann, D. Colburn, L. Swartzman, Vaginal atrophy in the postmenopausal women. The importance of sexual activity and hormones, *JAMA* 249 (1983) 2195–2198.
- [9] L. Lipworth, H.O. Adami, D. Trichopoulos, K. Carlstrom, C. Matzoros, Serum steroid hormone levels, sex hormone-binding globulin, and body mass index in the etiology of postmenopausal breast cancer, *Epidemiology* 7 (1996) 96–100.
- [10] S.R. Davis, P. McCloud, B.J. Strauss, H. Burger, Testosterone enhances estradiol's effects on postmenopausal bone density and sexuality, *Maturitas* 21 (1995) 227–236.
- [11] E. Fels, Treatment of breast cancer with testosterone propionate. A preliminary report, *J. Clin. Endocrinol.* 4 (1944) 121–125.
- [12] A. Segaloff, D. Gordon, B.N. Horwitt, J.V. Schlosser, P.J. Murison, Hormonal therapy in cancer of the breast. I. The effect of testosterone propionate therapy on clinical course and hormonal excretion, *Cancer* 4 (1951) 319–323.
- [13] F. Labrie, R. Poulin, J. Simard, V. Luu-The, C. Labrie, A. Bélanger, Androgens, DHEA and breast cancer, in: T. Gelfand (Ed.), *Androgens and Reproductive Aging*, Taylor and Francis, Oxfordshire UK, 2006, pp. 113–135.
- [14] F. Labrie, Intracrinology, *Mol. Cell. Endocrinol.* 78 (1991) C113–C118.
- [15] F. Labrie, A. Bélanger, L. Cusan, B. Candas, Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2403–2409.
- [16] C. Labrie, A. Bélanger, F. Labrie, Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate, *Endocrinology* 123 (1988) 1412–1417.
- [17] M. Dowsett, E. Folkard, Deficits in plasma oestradiol measurement in studies and management of breast cancer, *Breast Cancer Res.* 7 (2005) 1–4.
- [18] L.M. McShane, J.F. Dorgan, S. Greenhut, J.J. Damato, Reliability and validity of serum sex hormone measurements, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5 (1996) 923–928.
- [19] S. Rinaldi, H. Dechaud, C. Biessy, V. Morin-Raverot, P. Toniolo, A. Zeleniuch-Jacquotte, A. Akhmedkhanov, R.E. Shore, G. Secreto, A. Ciampi, E. Riboli, R. Kaaks, Reliability and validity of commercially available, direct radioimmunoassays for measurement of blood androgens and estrogens in postmenopausal women, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10 (2001) 757–765.
- [20] J.F. Dorgan, T.R. Fears, R.P. McMahon, L. Aronson Friedman, B.H. Patterson, S.F. Greenhut, Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry, *Steroids* 67 (2002) 151–158.
- [21] J. Poortman, J.H. Thijssen, A.A. von Landeghem, M.A. Wiegerinck, G.P. Alsbach, Subcellular distribution of androgens and oestrogens in target tissue, *J. Steroid Biochem.* 19 (1983) 939–945.
- [22] F. Labrie, A. Dupont, A. Bélanger, Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer, in: V.T. de Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg (Eds.), *Important Advances in Oncology*, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1985, pp. 193–217.
- [23] B. Bélanger, A. Bélanger, F. Labrie, A. Dupont, L. Cusan, G. Monfette, Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men, *J. Steroid Biochem.* 32 (1989) 695–698.
- [24] A. Bélanger, G. Pelletier, F. Labrie, O. Barbier, S. Chouinard, Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans, *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (2003) 473–479.
- [25] H. Zwicker, R.S. Rittmaster, Androstosterone sulfate: physiology and clinical significance in hirsute women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76 (1993) 112–116.



Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration

Fernand Labrie^{a,*}, Alain Bélanger^a, Patrick Bélanger^a, René Bérubé^a, Céline Martel^a,
 Leonello Cusan^a, José Gomez^a, Bernard Candas^a, Véronique Chaussade^{b,c},
 Isabelle Castiel^c, Claire Deloche^c, Jacques Leclaire^c

^a Laboratory of Molecular Endocrinology and Oncology, Laval University Hospital Research Center (CRCHUL) and Laval University, Québec City, Québec G1V 4G2, Canada

^b Service de Dermatologie du Pr Philippe Saiag, Hôpital Ambroise Paré, 9 Avenue Charles de Gaulle, 92104 Boulogne Cedex, France

^c L'Oréal Recherche, 90, rue du Général Roguet, Centre Charles Zviak, 92583 Clichy Cedex, France

Received 13 July 2006; accepted 11 September 2006

Abstract

The marked decline in serum dehydroepiandrosterone (DHEA) with age is believed to play a role in health problems associated with aging, these health issues being potentially preventable or reversible by the exogenous administration of DHEA.

In the present study, liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry (LC/MS/MS) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) were used to measure the serum levels of DHEA and 11 of its metabolites in seventy-five 60–65-year-old Caucasian women who received 3 g of 0.1%, 0.3%, 1.0% or 2.0% DHEA cream or placebo applied twice daily on the face, upper chest, arms and legs. The serum levels of DHEA increased 574% over control at the 2.0% DHEA dose while the sum of the androgen metabolites androsterone glucuronide (ADT-G), 3 α -androstenediol-3G (3 α -diol-3G) and 3 α -diol-17G increased by only 231%. On the other hand, serum testosterone and dihydrosterone were increased by 192% and 275%, respectively, above basal levels compared to 139% and 158% for estrone and estradiol. Such data show that the transformation of exogenous DHEA in postmenopausal women is preferentially into androgens rather than into estrogens. On the other hand, the present data indicate that serum DHEA measurements following DHEA supplementation in postmenopausal women are an overestimate of the formation of active androgens and estrogens and suggest a decreased efficiency of transformation of DHEA into androgens and estrogens with aging.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Menopause; Intracrinology; Sex steroids; Androgens; Estrogens; DHEA; Androsterone glucuronide; Androstenediol glucuronide; Percutaneous; Steroid assays; Mass spectrometry

1. Introduction

It is remarkable that man, in addition to possessing very sophisticated endocrine and paracrine systems for steroids has largely vested in sex steroid formation in peripheral tissues [1–7]. In fact, while the ovaries and testes are the

exclusive sources of androgens and estrogens in lower mammals [8], the situation is very different in man and higher primates [9,10], where active sex steroids are in large part or wholly synthesized locally in peripheral tissues from the precursor dehydroepiandrosterone (DHEA), thus providing target tissues with the appropriate controls to adjust the formation and metabolism of sex steroids according to local requirements.

The marked reduction in the formation of DHEA by the adrenals during aging [11–15] results in a dramatic fall in the formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues, a situation believed to be associated with age-related

* Corresponding author at: Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, Laval University Medical Center (CHUL), 2705, Laurier Boulevard, Québec City, Québec G1V 4G2, Canada. Tel.: +1 418 654 2704; fax: +1 418 654 2735.

E-mail address: fernand.labrie@crchul.ulaval.ca (F. Labrie).

health problems such as insulin resistance [16,17] and obesity [18–20]. On the other hand, much attention has been given to the benefits of DHEA administered to postmenopausal women, especially on the bone, skin, muscle, vagina, adipose tissue, insulin resistance and well being after oral and percutaneous administration [4,21–23].

Following cessation of estrogen secretion by the ovaries in postmenopausal women, all estrogens and almost all androgens are made locally from DHEA in the peripheral target tissues with minimal diffusion of the active steroids outside these tissues. Consequently, when one desires to have access to markers of total sex steroid activity, it becomes essential to measure the steroid metabolites which represent the obligatory exit route of all steroids and are measurable in the circulation. For the androgens, it is now well established that uridine glucuronosyl transferase 2B7 (UGT 2B7), UGT 2B15 and UGT 2B17 are the three enzymes responsible for the glucuronidation of all androgens and their metabolites in the human [24]. This recent completion of the identification and characterization of all the human UDP-glucuronosyl transferases makes possible the use of the glucuronide derivatives of androgens as markers of total androgenic activity in both women and men.

Since, as mentioned above, DHEA is believed to play an important role against various problems associated with menopause and aging, it was felt important to investigate in detail the metabolism of various doses of DHEA administered percutaneously. This route of administration was chosen in order to avoid the first passage of DHEA through the liver. Liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry (LC/MS/MS) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) were used to measure nine androgens, their precursors and metabolites as well as estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) and E1-sulfate (E1-S) in five groups of 15 postmenopausal women who received 3.0 g of 0.1%, 0.3%, 1.0% or 2.0% DHEA or placebo cream applied on the skin, twice daily.

2. Subjects

Seventy-five (75) healthy postmenopausal Caucasian women aged 60–65 years participated in this study after IRB approval and having given written informed consent. No subject had taken hormone replacement therapy during the previous 6 months. No subject was suffering from an endocrine disorder, and none was under treatment with lipid- or glucose-lowering agents. There was no active or history of thromboembolic disease, significant metabolic or endocrine disease and no clinically significant gastrointestinal, liver or gallbladder disease. There was no migraine and no diabetes mellitus not controlled by conventional therapy. There was no corticosteroid treatment within 6 weeks of study entry as well as treatment with β -carotenoid, retinoic acid, hydroquinone, α -hydroxyacid (including inhaled, topical or oral). There was no hypertension equal to or above 160/95 mmHg

or not controlled by standard therapy as well as no confirmed clinically significant depression or confirmed severe psychiatric disturbance.

There was no administration of any investigational drug within 30 days of screening visit or previous treatment with androgens or anabolic steroids within 6 months prior to the screening visit. There was no exposure to or use of antidepressants, antipsychotics, or analgesics, within 30 days prior to enrollment. Smoking any number of cigarettes was an exclusion criteria. There was no former or present narcotic addiction or alcoholism. The body weight ranged between 18.5 and 29.9 of ideal body weight according to body mass index (BMI). There was no hepatic or renal impairment or condition known to affect drug or steroid metabolism. All subjects had a medical history, complete physical examination, serum biochemistry as well as complete blood and urinalysis.

Each subject was randomly assigned to one of the five treatment groups namely placebo, 0.1% DHEA, 0.3% DHEA, 1% DHEA and 2.0% DHEA. Daily, before breakfast, and after supper, for 13 weeks, subjects received 3.0 ml of one of the five emulsions. All subjects were instructed to apply the study treatment twice daily (in the morning between 6:00 and 9:30 h and in the evening between 18:00 and 21:30 h) during 13 weeks. The first application of the study treatment was carried out at the investigational site where instructions were provided to the subjects on how to apply the topical emulsion. Three hundred microliters (0.3 ml) of the emulsion were applied on the forehead including 2 cm past the hair line, 0.3 ml on the face (right side), 0.3 ml each on the back of right and left arms, 0.3 ml each on the external face of the right and left legs for a total dose of 3.0 ml of DHEA emulsion twice daily. For each woman, blood sampling was performed at the same time in the morning (± 10 min) throughout the study, with the exception of the blood sample collected at screening visit, which was taken in the morning or afternoon up to 3 weeks prior to study initiation (day 1). On day 1 of the study, blood sampling was performed within 2 h prior to the first application of placebo or DHEA creams. The application of the cream was performed after blood sampling.

3. Materials and methods

3.1. Quantitation of steroids in human serum: human blood sample collection for measurement of DHEA and related steroids

The serum steroid levels of DHEA, DHEA-S, androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (5-diol), testosterone, androstenedione (4-dione), dihydrotestosterone (DHT), androsterone, estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), E1-sulfate (E1-S), androsterone glucuronide (ADT-G), androstane-3 α ,17 β -diol-3-glucuronide (3 α -diol-G) and 3 α -diol-17G were measured by mass spectrometry at the Laboratory of Molecular

Endocrinology and Oncology, CHUL Research Center (Research Center of Le Centre Hospitalier de l'Université Laval).

3.2. Analysis of non-conjugated steroids

3.2.1. Preparation of calibration curve of standard samples and extraction of steroids from human serum

DHEA, 5-diol, 4-dione, testo, and DHT are analyzed by GC/MS. On each day of analysis, calibration standards ranging from 0.2 to 20 ng/ml for DHEA and 5-diol, from 0.05 to 10 ng/ml for 4-dione and testo, from 0.02 to 4 ng/ml for DHT, from 8.00 to 400 pg/ml for E1 and from 2.00 to 400 pg/ml for E2, are prepared using charcoal-adsorbed human serum.

For the extraction of steroids, 500 μ l of a 0.5 M sodium acetate solution is added to each tube (1.0 ml for calibration standards). A methanolic solution (50 μ l), containing a mixture of deuterated steroid internal standards, is then added to each tube. Aliquots of 0.75 ml of study samples (0.25 ml for calibration standards) are added and tubes are vortexed for ca. 1 min.

1-Chlorobutane (3 ml) is then added to each tube and mixed. After centrifugation, the organic extracts are collected and purified on LC-Si SPE columns. Columns and the adsorbed material are washed with ethyl acetate:hexane (ca. 6 ml; 1:9, v:v). The analytes of interest are then eluted using 4 ml ethyl acetate:hexane (50:50, v:v) which is evaporated at 50 °C. The dried residue is reconstituted in 0.5 ml ethyl acetate and vortexed for ca. 15 s.

An aliquot of 100 μ l is transferred to a glass tube for the assay of 4-dione and the remaining extract is kept in the tube for the assay of DHEA, 5-diol, testo, DHT, E1 and E2. Both extracts are evaporated at 50 °C.

3.2.2. Derivatization of DHEA, 5-diol, testo, DHT, E1 and E2

Pentafluorobenzoylchloride in ethyl acetate (50 μ l; 1/10, w/v) and pyridine in ethyl acetate (500 μ l; 1:99, v:v) are added to the dried residue of DHEA, 5-diol, testo and DHT and the samples are incubated for ca. 30 min at 60 °C. After evaporation of the reagent mixture, a solution of 0.5 M NaHCO₃ (1.0 ml) is added to the tubes, which are then left to react for 15 min at room temperature. Hexane (2 ml) is then added to the tubes, which are vortexed for ca. 2 min and left at room temperature for ca. 10 min. The organic phase is evaporated at 50 °C and the final extract reconstituted in 50 μ l isooctane and then transferred into a conical vial for injection into the GC/MS.

3.2.3. Derivatization of 4-dione

A solution of 1 mg pentafluorobenzylhydroxylamine/mL pyridine (100 μ l) is added to the 4-dione extract and the tubes are incubated for ca. 30 min at 60 °C. After derivatization, the tubes are left to cool at room temperature for ca. 5 min and hexane (3 ml) is added to the samples. The mixtures are vortexed for ca. 5 s and then evaporated at 50 °C.

The final extract is reconstituted in 50 μ l isooctane and then transferred into a conical vial for injection into the GC/MS system.

3.2.4. Analysis by GC/MS

The GC/MS system for the analysis of DHEA, 5-diol, 4-dione, testo, DHT, E1 and E2 uses a 50% phenyl-methyl polysiloxane (DB-17HT) capillary column (30 m \times 0.25 mm internal diameter, 0.15 μ m film thickness) with helium as the carrier gas. The analytes and IS are detected using a HP5973 quadrupole mass spectrometer equipped with a chemical ionization source.

3.3. Analysis of the conjugated steroids—ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G

3.3.1. Preparation of calibration curve of standard samples and extraction from human serum

ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G are analyzed by a LC/MS/MS method using TurboIonSpray. On each day of analysis, calibration standards ranging from 2 to 200 ng/ml for ADT-G and from 0.50 to 50 ng/ml for 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G are prepared using a mixture of charcoal-adsorbed serum:water (1:1, v:v).

For extraction from serum, 500 μ l of serum sample is transferred to each tube. Water (500 μ l) is added and the tubes are then vortexed. A methanolic solution (100 μ l) containing the deuterated steroid internal standard is then added to each tube. A solution of NaH₂PO₄/citric acid buffer (1.5 ml) is added and the tubes are vortexed again.

Samples are transferred to the C-18 SPE columns. Each column is then washed with water and a solution of methanol:water (50:50, v:v). The analytes of interest are then eluted using a solution (4 ml) of methanol:water (80:20, v:v), containing 10 mM ammonium acetate. The eluates are evaporated at 45 °C and the dried residue is reconstituted in a solution (100 μ l) of methanol:water (50:50, v:v) containing 0.01% acetic acid prior to analysis.

3.3.2. Analysis by LC/MS/MS

The HPLC system uses a 150 mm \times 4.6 mm, 4- μ m particle size Synergy Hydro-RP column at a flow rate of 1.0 ml/min. ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G are detected using a Sciex API 3000 triple quadrupole mass spectrometer, equipped with TurboIonSprayTM.

3.4. Analysis of the conjugated steroids DHEA-sulfate (DHEA-S) and E1-S

3.4.1. Preparation of calibration curve standard samples and extraction from human serum

DHEA-S and E1-S are analyzed by a LC/MS/MS method using TurboIonSpray. On each day of analysis, calibration standards ranging from 0.075 to 10 μ g/ml for DHEA-S and from 0.075 to 10 ng/ml for E1-S are prepared using PBS:charcoal adsorbed serum (1:1, v:v).

For extraction from serum, 100 μ l of the serum sample is transferred to individual tubes and 2 ml of PBS buffer is added. A methanolic solution (50 μ l) containing the deuterated steroid internal standard is then added to each tube. Samples are transferred on Oasis HLB SPE columns and each column is washed with water and methanol:water (10:90, v:v). The analytes of interest are then eluted with 4 ml of methanol. Methanol is evaporated at 35 °C and the dried residue reconstituted in 125 μ l of methanol:water (50:50, v:v) and then filtered on 0.2 μ m nylon filter. Part of this solution (20 μ l) is diluted in 0.5 ml of methanol:water (50:50, v:v) containing 5 mM ammonium acetate and 0.01% acetic acid for the DHEA-S analysis. The remaining part is used directly for E1-S analysis.

3.4.2. Analysis by LC/MS/MS

For DHEA-S analysis, the HPLC system uses a 100 \times 3.2-mm, 5- μ m particle size, Phenomenex Columbus C18 column at a flow rate of 0.5 ml/min. DHEA-S is detected using a Sciex API 300 or API 3000 triple quadrupole mass spectrometer equipped with Turbolonspray™. For E1-S analysis, the HPLC system uses a 100 \times 4.6 mm, 35 μ m particle size Phenomenex Luna C18 column at a flow rate of 1.0 ml/min. E1-S is detected using a Sciex API 365 or API 3000 triple quadrupole mass spectrometer, equipped with Turbolonspray.

3.4.3. Coefficients of variation of steroid assays by mass spectrometry

The intra- and inter-assay coefficients of variation are indicated on Table 1.

3.4.4. Statistical analysis

The means and standard errors (S.E.M.) of serum concentrations were calculated for each group and timepoints (Figs. 2 and 3). Since the serum concentrations of most of steroids had reached a plateau at 1 week, the values obtained

in each woman at 1 week and after were considered as replicates after treatment. A paired *t*-test was applied by pairing these replicates with the mean of two basal values (screening and day 1) for each subject. The *p* values were corrected by the Bonferroni formula to take account of the multiple statistical tests. The mean serum values and 5th to 95th centiles in 47 normal cycling premenopausal women 30–35 years old are provided to illustrate normal ranges observed in normal young women.

4. Results

In order to better visualize the effect of DHEA administration on the serum levels of DHEA and 11 steroids derived from DHEA, Fig. 1 illustrates the pathways of transformation of DHEA into its multiple metabolites, including testosterone, DHT and the glucuronide derivatives of androgens which are the main parameters under investigation in the present study (Fig. 1).

As illustrated in Figs. 2 and 3, serum DHEA as well as all its metabolites have already reached maximal values 1 week following twice daily administration of 3 g of the DHEA cream at all doses. With 15 subjects in each group on day 1, there were 13–15 subjects per group at week 13 for the 0%, 0.1% and 0.3% DHEA creams while there were 10 and 3 subjects remaining for the 1.0% and 2.0% DHEA creams, respectively. In these two groups, 5 and 10 women, respectively, were stopped at 8 weeks for serum levels of DHEA above 11 ng/ml. Since the women having the highest serum DHEA values were those stopped at week 8, the values obtained at week 13 for the remaining women were not retained in the calculation in order to avoid bias.

Since the serum concentration of most steroids had reached a plateau at 1 week, the values obtained at 1, 2, 4, 8 and 13 weeks were pooled for the 0.1% and 0.3% creams while values obtained at 1, 2, 4 and 8 weeks were pooled for the 1.0% and 2.0% creams. These pooled values were compared to basal values as well as to the values found in 47 normal cycling premenopausal women of 30–35 years of age (Figs. 4 and 5). This analysis is important in order to compare the concentrations achieved following treatment of postmenopausal women with the various concentrations of the DHEA creams with the serum concentrations of the same steroids observed in normal young women.

From a baseline value measured at 1.80 ± 0.10 ng/ml, serum DHEA increased to 2.23 ± 0.17 ng/ml ($p < 0.005$), 4.07 ± 0.37 ng/ml ($p < 0.01$), 7.91 ± 0.41 ng/ml ($p < 0.01$), and 12.13 ± 1.28 ng/ml ($p < 0.01$) at the doses of 0.1%, 0.3%, 1.0% and 2.0% DHEA, respectively for an increase of 574% over control at the highest dose (Table 2). These values are to be compared with serum DHEA concentrations of 4.47 ± 0.32 ng/ml in 30–35 year-old premenopausal women with 5th and 95th centile values of 1.53 and 9.14 ng/ml, respectively (Fig. 4A). Serum DHEA-S, on the other hand, increased from 502 ± 28 to $1232 \pm$

Table 1
Intra- and inter-assay coefficients of variation (%) for 12 steroids measured by GC/MS and LC-MS/MS in human samples (endogenous steroids)

Steroid	ng/ml	Coefficient of variation	
		Within runs	Between runs
DHEA ^a	2.44	2.0	1.9
DHEA-S ^b	593	5.2	6.3
5-Diol ^a	0.91	9.5	13.1
4-Dione ^a	0.62	3.7	4.2
Testo ^a	0.48	2.9	3.4
DHT ^a	0.11	3.1	4.1
ADT-G ^b	22.8	3.1	3.7
3 α -Diol-3G ^b	0.79	10.3	10.7
3 α -Diol-17G ^b	1.65	4.6	5.3
E1 ^a	60.8	1.8	1.8
E2 ^a	19.2	3.5	3.7
E1-S ^b	279	4.5	6.0

^a GC/MS.

^b LC-MS/MS.

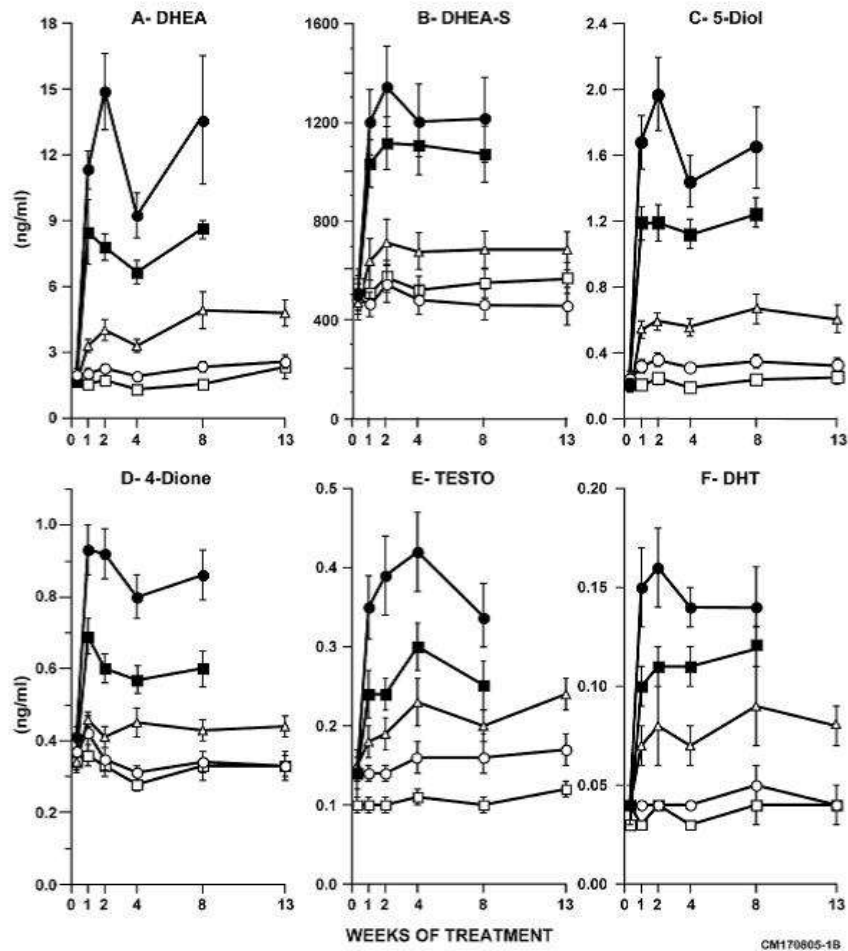


Fig. 2. Serum levels of (A) dehydroepiandrosterone (DHEA), (B) dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), (C) androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (5-DIOL), (D) androstenedione (4-DIONE), (E) testosterone (TESTO) and (F) dihydrotestosterone (DHT) in 55–65 year-old post-menopausal women following twice daily percutaneous application of placebo emulsion (\square) or 0.1% (\circ), 0.3% (Δ), 1.0% (\blacksquare) or 2.0% (\bullet) DHEA emulsion for up to 13 weeks. Data are expressed as means \pm S.E.M. ($n = 13$ –15).

tion. The serum E2 levels increased from 3.53 ± 0.30 pg/ml (baseline) to 6.07 ± 0.82 and 9.12 ± 1.20 pg/ml at the 1.0% and 2.0% DHEA concentrations, respectively (Fig. 5E) for a 158% increase over control at the highest dose. It can be seen that serum E1-S follows a pattern almost identical to E1 and E2 with a maximal 134% increase over control from a baseline of 232 ± 23 pg/ml to 544 ± 110 pg/ml at the highest DHEA dose.

5. Discussion

The present study is the first one to measure by GC/MS and LC/MS/MS, the best available technology, the changes

in serum steroid levels induced by the exogenous administration of DHEA in the human. Since DHEA has been administered percutaneously, thus avoiding the high level of metabolism which accompanies the first pass through the liver at the higher and transient DHEA concentrations seen after oral administration, the present results should closely mimic the physiological metabolism of endogenous DHEA secreted by the adrenals.

A first interesting observation is that the 574% increase over basal levels of the serum DHEA concentration observed with the 2.0% DHEA cream is not accompanied by the same amplitude of changes in the serum levels of any other steroid (except 5-diol), including the glucuronide metabolites of androgens (Fig. 6, Table 2). Such data suggest

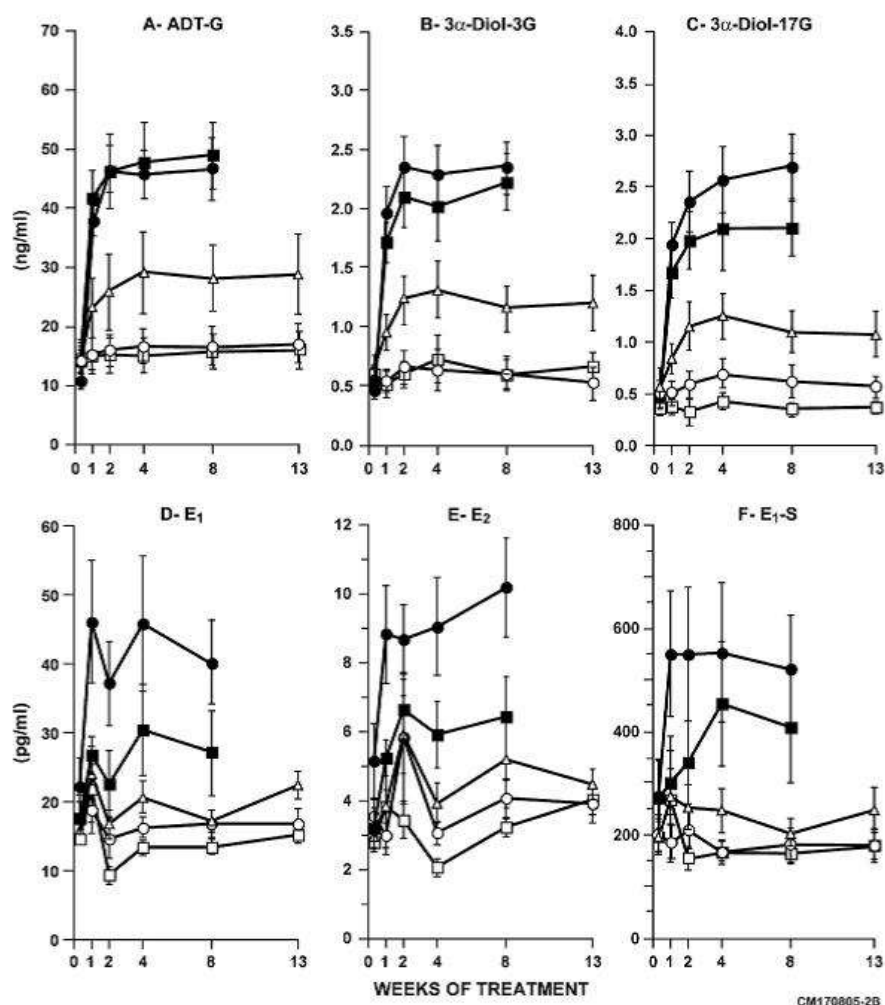


Fig. 3. Serum levels of (A) androsterone glucuronide (ADT-G), (B) androstane-3 α ,17 β -diol 3-glucuronide (3 α -DIOL-3G), (C) androstane-3 α ,17 β -diol 17-glucuronide (3 α -DIOL-17G), (D) estrone (E₁), (E) estradiol (E₂) and (F) estrone sulfate (E₁-S) in 55–65-year-old post-menopausal women following twice daily percutaneous application of placebo emulsion (\square) or 0.1% (\circ), 0.3% (Δ), 1.0% (\blacksquare) or 2.0% (\bullet) DHEA emulsion for 13 weeks. Data are expressed as means \pm S.E.M. ($n = 13$ –15).

that, at least in postmenopausal women, the serum DHEA concentrations measured after DHEA administration are a significant overestimate of the effect of DHEA on the circulating levels of the active androgens (Table 2). In fact, the 574% increase over control of serum DHEA leads to only 192% and 275% increases of serum testosterone and DHT, respectively. More significantly, since all androgens are eliminated from the organism as the glucuronide derivatives of ADT and 3 α -diol that must necessarily pass through the circulation, the 574% increase in serum DHEA leads to only a 231% increase in the sum of the serum levels of ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G (Table 2), thus indicating that a 574% increase in serum DHEA translates

only to a 231% increase in the total formation of androgens. Such data indicate that the efficacy of transformation of exogenous 2.0% DHEA cream into androgens is only 40% compared to the efficacy of the enzymatic machinery under basal conditions (Figs. 6 and 7). Taking the efficacy of transformation of DHEA under basal conditions as 100%, the efficacy observed with the 0.3% and 1.0% creams decreases to 79% and 72%, respectively, to reach, as mentioned above, only 40% with the 2.0% DHEA cream (Figs. 6 and 7).

The apparent saturation of the enzymatic process is best illustrated in Fig. 6 showing a complete saturation of the formation of androgen metabolites at 7.9 ng DHEA/ml. This

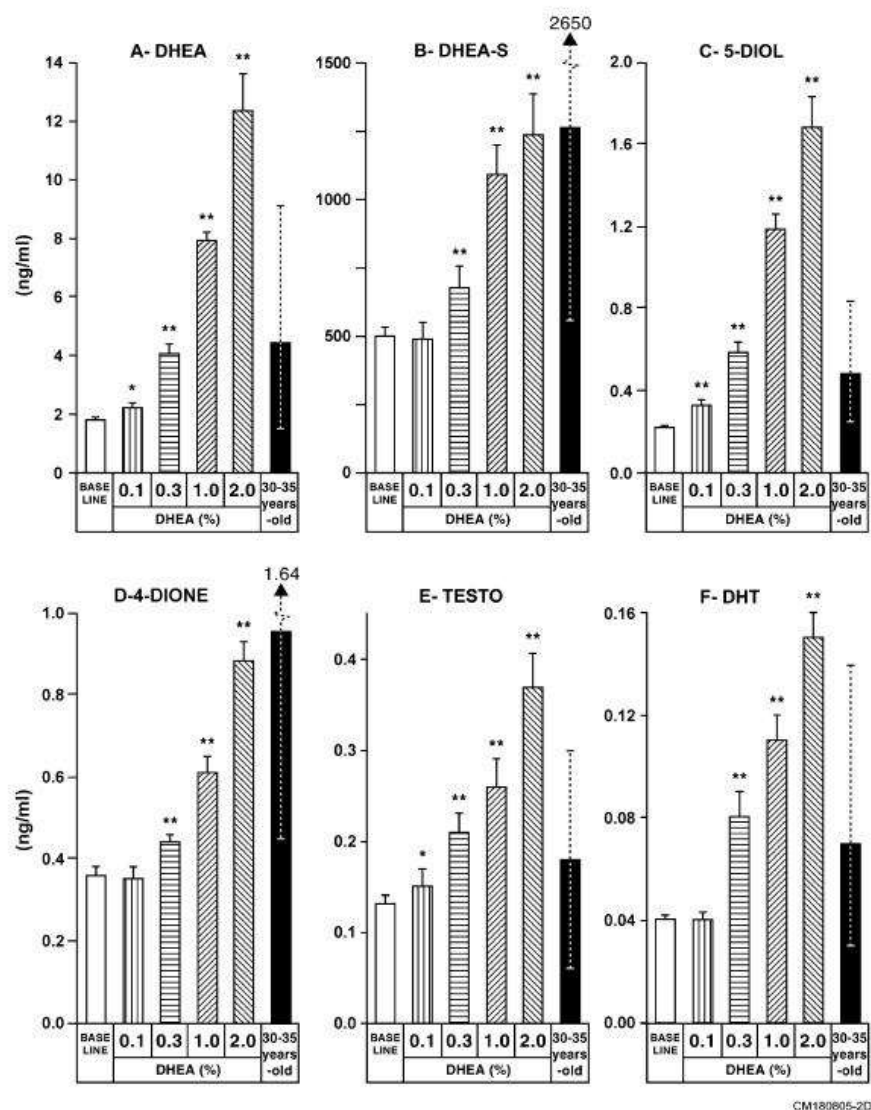


Fig. 4. Serum levels of (A) DHEA, (B) DHEA-S, (C) 5-DIOL, (D) 4-DIONE, (E) TESTO and (F) DHT measured up to week 13 following percutaneous administration of 0.1%, 0.3%, 1.0% or 2.0% DHEA emulsion in 55–65-year-old post-menopausal women. Data are expressed as means \pm S.E.M. Serum steroid levels measured in 30–35-year-old premenopausal women are added as reference. Data are expressed as mean ($n=47$) while the 5th and 95th centiles are indicated (dashed lines). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, experimental vs. baseline values.

figure shows that this saturation value of serum DHEA is close to but still below the 95th centile of the serum DHEA concentration observed in control postmenopausal women, namely 9.1 ng/ml. Such data suggest that the administration of DHEA to postmenopausal women can lead to high serum levels of the steroid precursor DHEA which is not automatically transformed into active androgens due to a limiting factor in the enzymatic machinery leading to androgen formation.

It is also of interest to see in Table 2 that the transformation of exogenous DHEA into estrogens is even inferior to the transformation into androgens. Thus, at the highest DHEA concentration used, serum E1 and E2 increased by 139% and 158% over baseline, respectively, while serum testosterone and DHT increased by 192% and 275%, respectively. Serum E1-S, on the other hand, increased only 134% over control under the same conditions while, the sum of the androgen metabolites increased by 231%. It is thus quite clear from

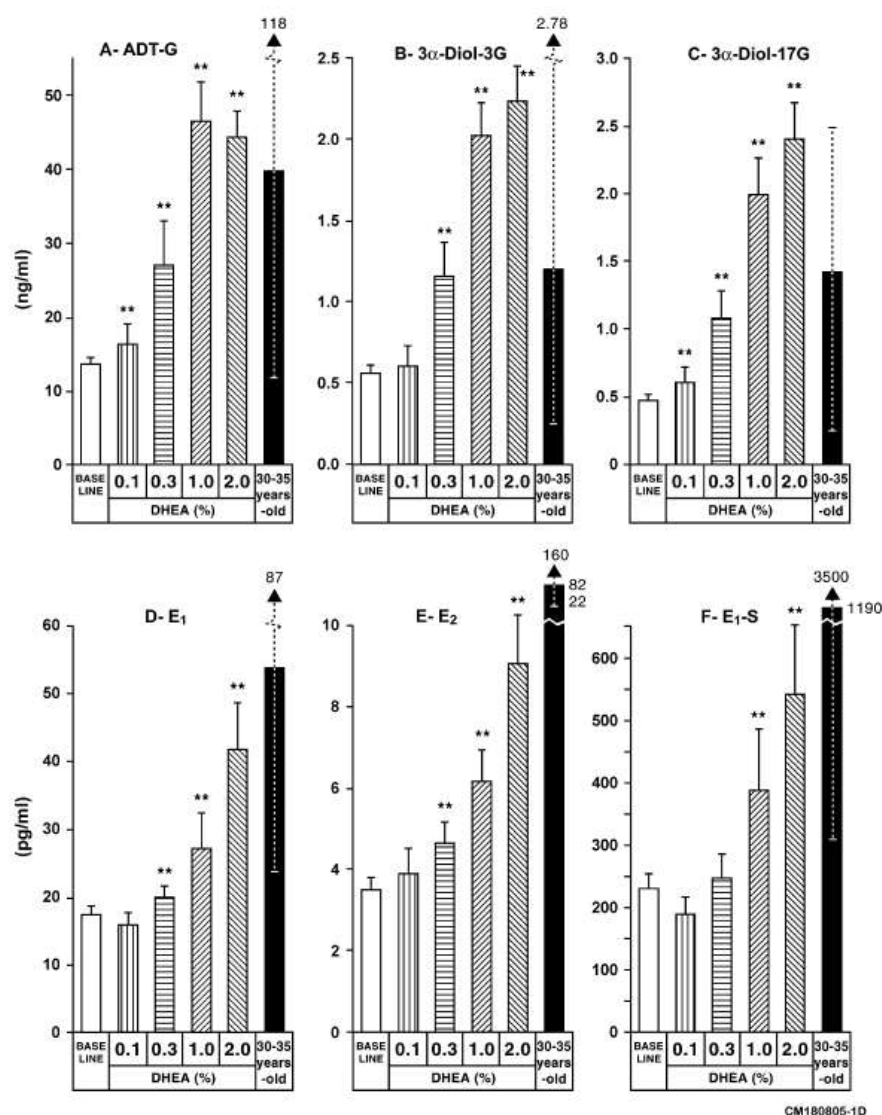


Fig. 5. Serum levels of (A) ADT-G, (B) 3 α -DIOL-3G, (C) 3 α -DIOL-17G, (D) E₁, (E) E₂ and (F) E₁-S measured up to week 13 following percutaneous administration of 0.1%, 0.3%, 1.0% or 2.0% DHEA emulsion in 55–65-year-old post-menopausal women. Data are expressed as means \pm S.E.M. Serum steroid levels measured in 30–35 year-old premenopausal women are added as reference. Data are expressed as mean ($n=47$) while the 5th and 95th centiles are indicated (dashed lines). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, experimental versus baseline values.

the present data that DHEA is preferentially transformed into androgens rather than into estrogens in postmenopausal women.

It should be mentioned that in 30–35-year-old premenopausal women, the average serum DHEA concentration of 4.47 ng/ml is accompanied by total serum levels of ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G of 42.85 \pm 15.68 with values of 12.7 ng/ml and 123.6 ng/ml for the 5th and 95th centiles, respectively (unpublished data). Thus, under basal condi-

tions, DHEA is transformed into the glucuronide derivatives of androgens with a similar efficacy in both premenopausal 30–35-year-old women (unpublished data) and in 60–65 year-old postmenopausal women of the present study. In fact, dividing the sum of serum ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G by the serum DHEA concentration gives a value of 9.59 for premenopausal women (42.85–4.47 ng/ml) while 8.13 is observed for postmenopausal subjects (14.63–1.80 ng/ml). It is to be remembered that the serum concentrations of ADT-

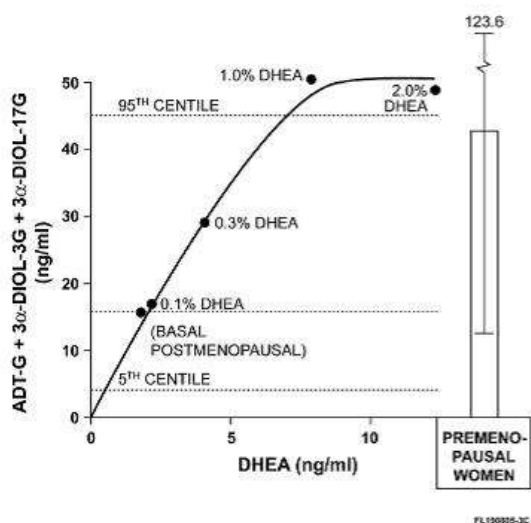


Fig. 6. Effect of increasing serum concentrations of DHEA induced by the twice daily percutaneous administration of 3 g of 0% (placebo), 0.1%, 0.3%, 1.0% or 2.0% DHEA cream on the sum of the serum levels of the androgen metabolites ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G expressed in ng/ml.

G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G represent the sum of all the androgen metabolites released from all tissues, thus leaving the possibility that this apparent decrease in the capacity to metabolize DHEA with age could well not apply to all tissues.

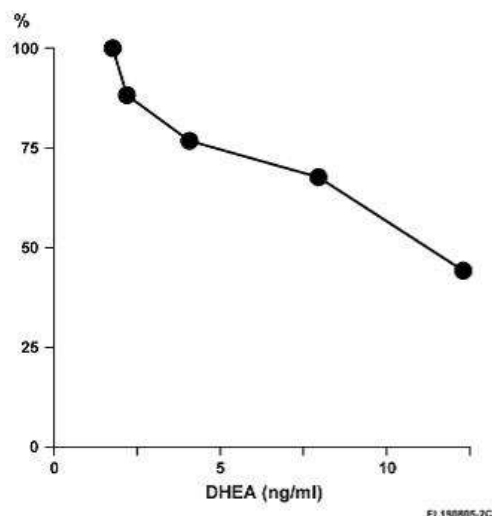


Fig. 7. Efficacy of transformation of DHEA into androgen metabolites (ADT-G + 3 α -diol-3G + 3 α -diol-17G) in postmenopausal women. The data are expressed as percentage of the transformation observed under basal serum DHEA concentrations of 1.80 ± 0.10 ng/ml taken as 100%. The efficacy is obtained by dividing the sum of the serum levels of ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G by the serum DHEA levels.

Acknowledgements

We thank Micheline Harvey for her skilful typing and preparation of the manuscript.

This study was sponsored by Endorecherche and l'Oréal.

References

- [1] C. Labrie, A. Bélanger, F. Labrie, Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate, *Endocrinology* 123 (1988) 1412–1417.
- [2] F. Labrie, *Intracrinology*, Mol. Cell. Endocrinol. 78 (1991) C113–C118.
- [3] F. Labrie, A. Dupont, A. Bélanger, Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer, in: V.T. de Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg (Eds.), *Important Advances in Oncology*, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1985, pp. 193–217.
- [4] F. Labrie, A. Belanger, L. Cusan, B. Candas, Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2403–2409.
- [5] E.R. Simpson, S.R. Davis, Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—some new perspectives, *Endocrinology* 142 (2001) 4589–4594.
- [6] F. Labrie, V. Luu-The, A. Bélanger, S.-X. Lin, J. Simard, C. Labrie, Is DHEA a hormone? *Starling Review*, *J. Endocrinol.* 187 (2005) 169–196.
- [7] C. Labrie, L. Cusan, M. Plante, S. Lapointe, F. Labrie, Analysis of the androgenic activity of synthetic “progestins” currently used for the treatment of prostate cancer, *J. Steroid Biochem.* 28 (1989) 379–384.
- [8] B. Bélanger, A. Bélanger, F. Labrie, A. Dupont, L. Cusan, G. Monfette, Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men, *J. Steroid Biochem.* 32 (1989) 695–698.
- [9] M. Leblanc, C. Labrie, A. Bélanger, B. Candas, F. Labrie, Bioavailability and pharmacokinetics of dehydroepiandrosterone in the cynomolgus monkey, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (9) (2003) 4293–4302.
- [10] M. Leblanc, M.C. Bélanger, P. Julien, A. Tchernof, C. Labrie, A. Bélanger, F. Labrie, Plasma lipoprotein profile in the male cynomolgus monkey under normal, hypogonadal and combined androgen blockade conditions, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 1849–1857.
- [11] C.J. Migeon, A.R. Keller, B. Lawrence, T.H. Shepard II, Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma. Effect of age and sex: day-to-day and diurnal variations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 17 (1957) 1051–1062.
- [12] N. Orentreich, J.L. Brind, R.L. Rizer, J.H. Vogelmann, Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59 (1984) 551–555.
- [13] A. Vermeulen, J.P. Deslypere, W. Schellhout, L. Verdonck, R. Rubens, Adrenocortical function in old age: response to acute adrenocorticotropin stimulation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54 (1982) 187–191.
- [14] A. Bélanger, B. Candas, A. Dupont, L. Cusan, P. Diamond, J.L. Gomez, F. Labrie, Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 1086–1090.
- [15] F. Labrie, A. Bélanger, L. Cusan, J.L. Gomez, B. Candas, Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2396–2402.
- [16] D.L. Coleman, E.H. Leiter, R.W. Schwizer, Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice, *Diabetes* 31 (1982) 830–833.
- [17] E.D. Schriock, C.K. Buffington, G.D. Hubert, B.R. Kurtz, A.E. Kitabchi, J.E. Buster, J.R. Givens, Divergent correlations of circulating dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone with insulin levels

- and insulin receptor binding, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (1988) 1329–1331.
- [18] E.G. MacEwen, I.D. Kurzman, Obesity in the dog: role of the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA), *J. Nutr.* 121 (1991) S51–S55.
- [19] J.E. Nestler, C.O. Barlascini, J.N. Clore, W.G. Blackard, Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (1988) 57–61.
- [20] A. Tchernof, J.P. Després, A. Dupont, A. Bélanger, A. Nadeau, D. Prud'homme, S. Moorjani, P.J. Lupien, F. Labrie, Relation of steroid hormones to glucose tolerance and plasma insulin levels in men, *Diabetes Care* 18 (1995) 292–299.
- [21] E.E. Baulieu, G. Thomas, S. Legrain, N. Lahlou, M. Roger, B. Debuire, V. Faucounau, L. Girard, M.P. Hervy, F. Latour, M.C. Leaud, A. Mokrane, H. Pitti-Ferrandi, C. Trivalle, O. de Lacharrière, S. Nouveau, B. Rakoto-Arison, J.C. Souberbielle, J. Raison, Y. Le Bouc, A. Raynaud, X. Girerd, F. Forette, Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHE age study to a sociobiomedical issue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 4279–4284.
- [22] A.J. Morales, J.J. Nolan, J.C. Nelson, S.S. Yen, Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (1994) 1360–1367.
- [23] P. Diamond, L. Cusan, J.L. Gomez, A. Bélanger, F. Labrie, Metabolic effects of 12-month percutaneous DHEA replacement therapy in postmenopausal women, *J. Endocrinol.* 150 (1996) S43–S50.
- [24] A. Bélanger, G. Pelletier, F. Labrie, O. Barbier, S. Chouinard, Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans, *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (2003) 473–479.

ANNEXE 6

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 112 (2008) 186–193



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb



Pangenomic changes induced by DHEA in the skin of postmenopausal women

E. Calvo^a, V. Luu-The^a, J. Morissette^a, C. Martel^a, C. Labrie^a, B. Bernard^b, F. Bernerd^b,
C. Deloche^b, V. Chaussade^b, J. Leclaire^b, F. Labrie^{a,*}

^a Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL Research Center) and Laval University, Québec City, Québec, G1V 4G2 Canada

^b L'Oréal Recherche, Centre Charles Zviak, 92583 Clichy Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 April 2008
Accepted 8 October 2008

Keywords:
Collagen
DHEA
Genomic profile
Human skin
Microarray

ABSTRACT

The objective of this study was to explore, for the first time, the changes in the pangenomic profile induced in human skin in women treated with dehydroepiandrosterone (DHEA) applied locally.

Sixty postmenopausal women participated in this phase II prospective, randomized, double-blind and placebo-controlled study. Women were randomized to the twice daily local application of 0% (placebo), 0.3%, 1% or 2% DHEA cream. Changes in the pangenomic expression profile were studied using Affymetrix Genechips.

Significant changes ($p < 0.05$) in sixty-six DHEA-responsive probe sets corresponding to 52 well-characterized genes and 9 unknown gene sequences were identified. A dose-dependent increase in the expression of several members of the collagen family was observed, namely COL1, COL3 and COL5 as well as the concomitant modulation of SPARC, a gene required for the normal deposition and maturation of collagen fibrils in the dermis. Several genes involved in the proliferation and differentiation of keratinocytes were also modulated. In addition, topical DHEA reduced the expression of genes associated with the terminal differentiation and cornification of keratinocytes.

Our results strongly suggest the possibility that DHEA could exert an anti-aging effect in the skin through stimulation of collagen biosynthesis, improved structural organization of the dermis while modulating keratinocyte metabolism.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The overall changes observed in the skin during aging, including thinning of the dermis, are likely related to a combination of intrinsic factors, especially changes in the hormonal status due to aging as well as extrinsic factors, especially photodamage by ultraviolet and infrared radiation from the sun and the influence of cigarette smoking [1].

Humans, along with the other primates, are unique among animal species in having adrenals that secrete large amounts of the inactive precursor steroids dehydroepiandrosterone (DHEA) and especially DHEA-sulfate (DHEA-S), which are converted into potent androgens and/or estrogens in peripheral tissues [2–4]. It is important to mention that recent data have shown that women have at least 50% as much androgens as men, the main source being

DHEA of adrenal origin [5]. However, serum DHEA as well as total androgens start to decline by the age of 30 years and they have already decreased by 60% at time of menopause [5], thus potentially providing an explanation for part of the mechanisms of skin aging. Tissue-specific treatment with DHEA appears a valuable replacement for traditional systemic hormonal replacement therapy (HRT) or estrogen replacement therapy (ERT) and thus avoid the reported side-effects, especially the increased risk of breast cancer [6,7].

All the steroidogenic enzymes that transform DHEA into dihydrotestosterone (DHT) or 17 β -estradiol (E2) are present in human skin, thus providing the enzymatic machinery necessary for the local synthesis of sex steroids from the inactive adrenal steroid precursor DHEA [8–10]. In fact, after cessation of sex steroids secretion by the ovaries at menopause, practically all sex steroids acting in the skin are synthesized locally from DHEA [11]. DHEA has already been shown to have beneficial effects on the skin of postmenopausal women, especially correction of the hyposeborrheic condition of the aged skin [12], increase of skin hydration and thickness, and reduction of skin pigmentation [13]. Some data have already reported an effect of DHEA on collagen synthesis and degradation [14–16].

* Corresponding author at: Laboratory of Molecular Endocrinology and Oncology, Laval University Hospital Research Center (CRCHUL) and Laval University, Québec City, Québec, G1V 4G2 Canada. Tel.: +1 418 654 2704; fax: +1 418 654 2735.
E-mail address: fernand.labrie@crchul.ulaval.ca (F. Labrie).

Little is known, however, about the gene expression changes induced by DHEA in the skin. This is the first global analysis of the DHEA-induced changes of the skin transcriptome. This study defines the effect of DHEA in postmenopausal women using Affymetrix microarrays to scan the whole human genome [17,18].

2. Materials and methods

2.1. Patients and sample preparation

Sixty healthy postmenopausal Caucasian women aged 60–65 years participated in this study after IRB approval and having given written informed consent. No subject had taken hormone replacement therapy during the previous 6 months. No subject was suffering from an endocrine disorder, and none was under treatment with lipid- or glucose-lowering agents. There was no migraine and no diabetes mellitus not controlled by conventional therapy. There was no corticosteroid treatment within 6 weeks of study entry as well as treatment with β -carotenoid, retinoic acid, hydroquinone, α -hydroxyacid (including inhaled, topical or oral).

There was no administration of any investigational drug within 30 days of screening visit or previous treatment with androgens or anabolic steroids within 6 months prior to the screening visit. There was no exposure to or use of antidepressants, antipsychotics, or analgesics, within 30 days prior to enrollment.

The body weight ranged between 18.5 and 29.9 of ideal body weight according to Body Mass Index (BMI). There was no hepatic or renal impairment or condition known to affect drug or steroid metabolism. All subjects had a medical history, complete physical examination, serum biochemistry as well as complete blood and urine analysis.

Each subject was randomly assigned to one of the four treatment groups, namely placebo, 0.3% DHEA, 1% DHEA and 2.0% DHEA. Daily, before breakfast, and after supper, for 13 weeks, subjects received 6.0 ml of one of the four emulsions (i.e. Water-in-oil cream containing 50% propylene glycol and 5% ethyl alcohol plus emollient, emulsifying and antioxidant agents for the placebo group and with the addition of the respective concentrations of DHEA for the treated groups). All subjects were instructed to apply the study treatment twice daily during 13 weeks, as previously described [5].

Two biopsies were obtained from the thigh of each patient, one before and the second one after treatment. The biopsies were done on the external face of the thighs 8 cm below the trochanter on a vertical line using the right or left side for pretreatment sample and the opposite side following 13 weeks of treatment. To collect the punch biopsies, local anesthesia was used, and a 2-mm diameter cylindrical core of skin was removed. Biopsies were immediately submerged and stored in liquid nitrogen until RNA extraction.

With 15 subjects in each group on day 1, there were 15, 15, 10 and 3 subjects per group at week 13 for the placebo, 0.3%, 1% and 2% DHEA creams, respectively. In the 1% and 2% DHEA groups, 5 and 10 women, respectively, were excluded at week 8 of treatment for serum levels of DHEA above 11 ng/ml. From the remaining women at the end of the study, samples from 13, 14 and 7 subjects, from placebo, 0.3% and 1% DHEA, respectively were analyzed. Since the women having the highest serum DHEA values were those stopped at week 8, the samples obtained at week 13 for the remaining women were not retained for the microarray study. In addition, 4 of the 10 women stopped after week 8 of 2% DHEA treatment were also analyzed.

2.2. High density oligonucleotide array hybridization

Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen) from individual biopsies. The samples were processed following the Small Sample Labeling Protocol version II from Affymetrix. This protocol was based on the principle of performing two cycles of cDNA synthesis and in vitro transcription (IVT) reactions for target amplification. Labelled cRNA was isolated using the RNeasy Mini Kit column (QIAGEN). Purified cRNA was fragmented to 200–300 mer using a fragmentation buffer. The quality of total RNA, cDNA synthesis, cRNA amplification and cRNA fragmentation was monitored by capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies). Fifteen micrograms of fragmented cRNA was hybridized in duplicate for 16 h at 45 °C with constant rotation, using a human oligonucleotide array U133 Plus 2.0 (Genechip, Affymetrix, Santa Clara, CA). After hybridization, chips were processed by using the Affymetrix GeneChip Fluidic Station 450 (protocol EukGE-WS2v5.450). Staining was made with streptavidin-conjugated phycoerythrin (SAPE) (Molecular Probes), followed by

Table 1
RT-PCR primers.

Gene symbol	GenBank	Region	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Size (bp)
CIRBP	NM_001280	430–592	GAGGAGGGGACCGAGGCTATG	TTGTGTGTAGCGTAAGTCTGTAACG	163
CLDN8	NM_199328	571–759	TACTTAGGATGGACCAACGGCA	ACACAACACACACTGACTCTCGA	189
COL1A1	NM_000088	4698–4876	AACCGAATGACCAAAACCAAAA	GGGAGCATTGGGGTTTCATAA	173
COL5A2	NM_000393	4630–4890	ACGGGAATGGAATGTGGGCA	TGCAGGATCAGCATTACTTCAAGAG	261
DNASE1L3	NM_004944	950–1158	CACCAACCCAGAGACATCCGTTA	CCGTGGTCTCTCTTGGTCCC	209
EEF2KL	NM_13302	2792–3020	TGCACACACCACTGACGJAAT	AGGGTACACACTGAAGTTGGAACTA	229
EFNA1	NM_004428	1100–1343	GAGAGAGCCAGGATGCCAGAT	GCTACACTCTAAGAAGAGTTGGCACA	244
ERBP	NM_014597	1848–2093	CTGCAGAAAGCCGTCTATACCT	GGGGAAGCCATCTCTATCATTTT	246
GBA/GBAP	NM_000157	1953–2199	AAAAGATCACTAAGCCCCAGTGT	CCTGATGCTGACACTGCTGCT	247
JAG1	AK023793	3339–3510	AGGTTGGGGTCTGATTAGTG	AATAAACACCTCGAGCTCAAGCA	172
KNTC2L	NM_006101	1549–1760	TGGAGGATACCTTGAACAATTGAATG	TTCACTGAGCCCTGCTTAAACA	212
KRT1B	BC033366	864–1096	CCTAAGCTCTGCATCAACCACTCT	CACAGCTACAGAGAACAGAGGCA	233
LEP7	AF005081	26–305	TCCTTGCCAGAGCTATTATGTTC	AATTCCCAACAGCAGCACCC	280
MT1X	NM_005952	12–232	CGGTGTTTCTCTTGTGCTGGG	GCTGCACTGTCTGACGTCCCT	221
NOL3	NM_003946	753–1001	GGATAGGACCTGGGATGCTGCT	GGGTGACCTGGGACTCTTAA	249
PLP	NM_015993	928–1152	ACGGGGGATCTGAGGCTGTGT	ACGGTGTTTAAAGGAAGGAGAGTGGT	225
RORCL	NM_005060	2771–3031	GTGGAGAAGGAAGCAGATGTGAT	GTGGGGTTTATGTTTACTCAGATGAA	261
RRM2	NM_001034	1435–1678	TTACCAACTAGCCACCACTGAAT	TGGCTGTGCTGTTAAAGGACT	244
S100A8/MRP8	NM_002964	82–335	GAATCTATCATGACGCTTACCACAA	ACTCTTTGTGGCTTTCTTCATGGCT	254
S100A9/MRP14	NM_002965	56–334	AAATGTCGAGCTGGAACGCA	CCTCGTGCATCTCTCGTGGGA	279
SERPIN B3	BC005224	1036–1154	CGGCTCTCGTCTATCTGGA	ATTAGTTGAAGTAGGTTGATCCGAA	119
SPARC	NM_003118	1804–2056	GCGAGCTCCAGGCTGTTTCA	TGAAATGCTTGGAGGTGAACGAGT	253
SPRR2G	NM_001014291	278–511	TGAACAACAAGATCCAGTGGCT	AACACACTGCTCTCAGGATAGGA	234
ZNF677	AK026366	233–463	GCCACACAATATGACCTCGG	TCCTGTACAAGGCCCTCTGG	231

Table 2Genes up or down-regulated by 1% or 2% DHEA ($p < 0.05$) in human skin of postmenopausal women.

Gene title	Gene symbol	Up or down		Molecular function
		DHEA 1%	DHEA 2%	
Dermis ECM				
Collagen, type V, alpha 2	COL5A2	▲	▲	Extracellular matrix structural constituent /// protein binding
Collagen, type V, alpha 1	COL5A1	n.s.	▲	Extracellular matrix structural constituent /// protein binding
Collagen, type I, alpha 1	COL1A1	▲	▲	Extracellular matrix structural constituent /// protein binding
Collagen, type I, alpha 2	COL1A2	▲	▲	Extracellular matrix structural constituent /// protein binding
Collagen, type III, alpha 1	COL3A1	▲	▲	Extracellular matrix structural constituent /// protein binding
Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	n.s.	▲	Collagen binding /// metal ion binding
Actin, alpha 1, skeletal muscle	ACTA1	▲	▲	Structural constituent of cytoskeleton /// protein binding /// ATP-ADP binding
Actin, alpha, cardiac muscle	ACTC	▲	▲	Nucleotide binding /// protein binding /// ATP binding /// structural molecule activity
Myosin, heavy polypeptide 3	MYH3	▲	▲	Microfilament motor activity /// nucleotide binding /// actin binding
Epidermal differentiation				
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 3	SERPINF3	▲	▲	Serine-type endopeptidase inhibitor activity
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 4	SERPINF4	▲	▲	Serine-type endopeptidase inhibitor activity
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100A9	▲	▲	Signal transducer activity /// calcium ion binding
S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100A8	n.s.	▲	Calcium ion binding /// calcium ion binding
Corneodesmosin	CDSN	n.s.	▼	Protein homodimerization activity
Claudin 8	CLDN8	n.s.	▼	Structural molecule activity /// protein binding
WAP four-disulfide core domain 3	WFDC3	n.s.	▼	Serine-type endopeptidase inhibitor activity /// endopeptidase inhibitor activity
Small proline-rich protein 2G	SPRR2G	▼	n.s.	Structural molecule activity
Keratin 1B	KRT1B	n.s.	▼	Structural molecule activity
Keratin 7	KRT7	▼	▼	Structural molecule activity /// protein binding
Late envelope protein 7	LEP7	▼	▼	Molecular function unknown
AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	AHNAK	▼	▼	Protein binding
Proliferation				
Nucleobindin 2	NUCB2	▲	▲	DNA binding /// calcium ion binding /// calcium ion binding
Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	SSB	▲	▲	Nucleic acid binding /// RNA binding
Deoxyribonuclease I-like 3	DNASE1L3	n.s.	▲	DNA binding /// endonuclease activity /// calcium ion binding
Topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa	TOP2A	▲	▲	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) activity /// protein kinase C binding
Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	SYNCRIP	▲	n.s.	Protein binding/// nucleic acid binding
Kinetochore associated 2	KNTC2	n.s.	▲	Protein binding
Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	RRM2	n.s.	▲	Ribonucleoside-diphosphate reductase activity /// iron ion binding /// protein binding
Transcriptional machinery				
Cold inducible RNA binding protein	CIRBP	n.s.	▼	Nucleic acid binding
RAR-related orphan receptor C	RORC	n.s.	▼	Transcription factor activity /// steroid hormone receptor activity /// zinc ion binding
Transformer-2 alpha	TRA2A	n.s.	▼	Nucleotide binding /// RNA binding /// nucleic acid binding
Eukaryotic elongation factor-2 kinase	EEF2K	n.s.	▼	Calcium ion binding /// translation factor activity, nucleic acid binding
Zinc finger protein 447	ZNF447	▼	n.s.	Transcription factor activity /// metal ion binding /// nucleic acid binding
Zinc finger protein 677	ZNF677	n.s.	▼	DNA binding /// metal ion binding /// nucleic acid binding
Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	NOL3	▼	▼	RNA binding /// identical protein binding /// protein binding
Odd-skipped related 1 (Drosophila)	OSR1	▼	▼	Nucleic acid binding /// zinc ion binding /// metal ion binding
MutS homolog 5 (E. coli)	MSH5	▼	▼	Nucleotide binding /// damaged DNA binding /// ATP binding
Estrogen receptor binding protein	ERBP	▼	▼	Receptor activity
Miscellaneous				
Decay accelerating factor for complement (CD55)	DAF	n.s.	▼	GPI anchor binding
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6	CEACAM6	n.s.	▼	GPI anchor binding
Ephrin-A1	EFNA1	n.s.	▼	Ephrin receptor binding /// GPI anchor binding
Metallothionein 1X	MT1X	n.s.	▼	Metal ion binding /// electron carrier activity
S100 calcium binding protein P	S100P	▼	▼	Metal ion binding /// calcium-dependent protein binding
Interleukin 1 family, member 7 (zeta)	IL1F7	n.s.	▼	Interleukin-1 receptor antagonist activity /// cytokine activity
Interleukin 1 family, member 10 (theta)	IL1F10	▼	▼	Interleukin-1 receptor antagonist activity /// cytokine activity
Glucosidase, beta; acid	GBA/GBAP	n.s.	▼	Glucosylceramidase activity /// hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
N-acetylglucosaminyltransferase-like 2	GALNTL2	▼	▼	Transferase activity /// metal ion binding /// sugar binding
Betacellulin	BTC	n.s.	▼	Growth factor activity
Jagged 1 (Alagille syndrome)	JAG1	▼	▼	Notch binding /// structural molecule activity /// growth factor activity
Plasma membrane proteolipid (plasmolipin)	PLLP	n.s.	▼	Ion channel activity
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2	ITPR2	▼	▼	Ion channel activity
Unknown				
Purkinje cell protein 4	PCP4	▲	▲	Molecular function unknown

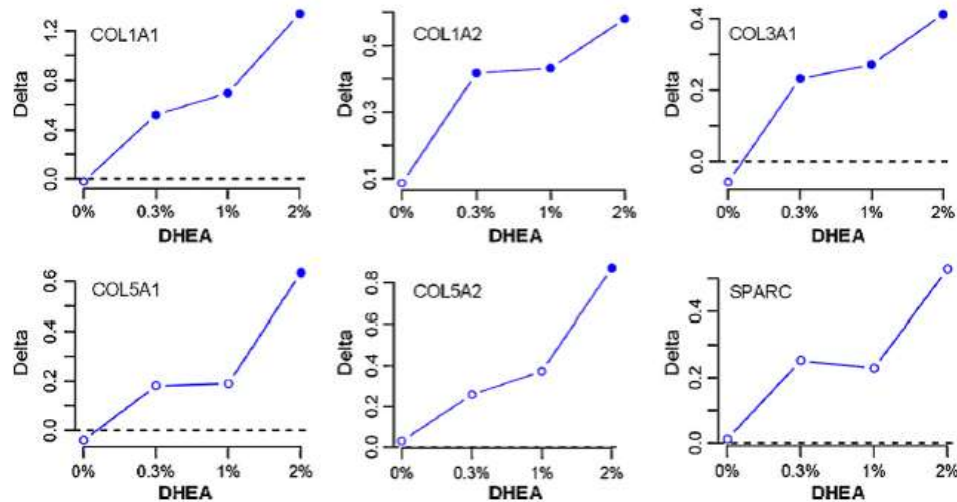


Fig. 1. DHEA stimulation of the expression profile of collagen and SPARC genes after twice daily placebo (0% DHEA), 0.3% DHEA, 1% DHEA or 2% DHEA treatment. Curves represent fold-change values (pre- and post-treatment) expressed as $\log_2(\Delta)$. Data are expressed as raw signal intensity after normalization by the RMA method. Filled dots correspond to a statistically significant difference ($p < 0.05$).

amplification with a biotinylated anti-streptavidin antibody (Vector Laboratories), and by a second round of SAPE. Chips were scanned using a GeneChip Scanner 3000 G7 (Affymetrix) enabled for High-Resolution Scanning.

The arrays included 1,300,000 unique oligonucleotide features covering over 47,000 transcripts and variants, which, in turn, represent approximately 38,500 of the best characterized human genes.

Chip images were extracted with the GeneChip Operating Software and analyzed with Limma package. Quality control of microarray chips was performed using the AffyQCReport software [19]. A comparable quality between microarrays was required for all microarrays within each experiment.

The background subtraction and normalization of probe set intensities was performed using the method of Robust Multiarray Analysis (RMA) described by Irizarry et al. [20]. The analysis was performed using the affymGUI Graphical User Interface for the Limma microarray package [21], and GeneSpring v7.2 software (Agilent).

2.3. Real-time PCR (RT-PCR)

The cDNA was reverse-transcribed from total RNA using 30 ng of Oligo(dT) primers, 300 U of Superscript III Rnase H-reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 500 μ M dNTPs, 5 mM dithiothreitol, and 34 U of human Rnase inhibitor

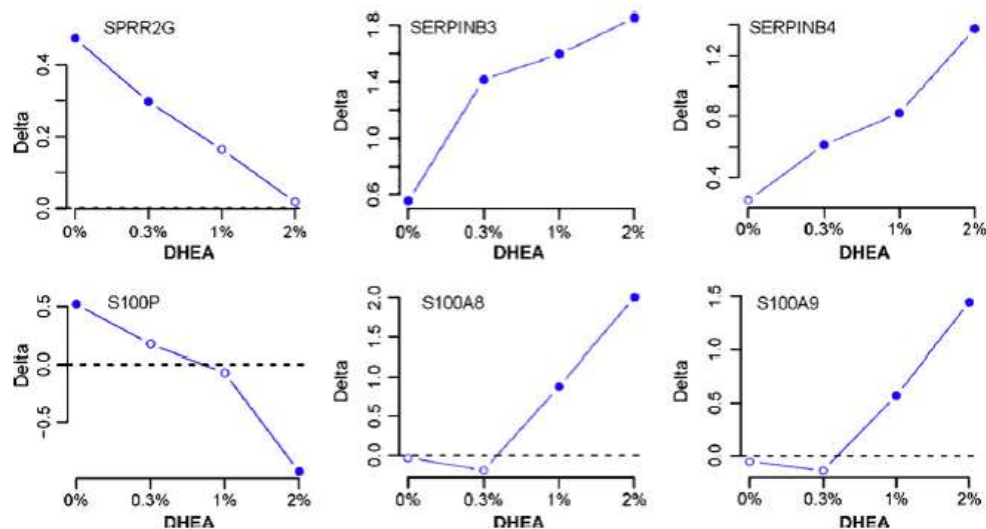


Fig. 2. DHEA modulation of keratinocyte-related genes. Data are expressed as raw signal intensity after normalization by the RMA method. Fold-change values (pre- and post-treatment) are expressed as $\log_2(\Delta)$. Filled dots correspond to a statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 3

Validation by RT-PCR of genes modulated by 1% or 2% DHEA.

Gene title	Gene symbol	DHEA 1%			DHEA 2%		
		Arrays	RT-PCR		Arrays	RT-PCR	
			Fold-change ^a	p-Value		Fold-change ^a	p-Value
S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100A8	n.s.	20.21	<0.0001	▲	44.97	<0.0001
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100A9	▲	10.74	<0.0001	▲	44.95	<0.0001
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor B3	SERPINE3	▲	6.77	<0.0001	▲	8.39	<0.0001
Kinetochore associated 2	KNTC2L	n.s.	2.38	<0.3	▲	6.44	<0.2000
Estrogen receptor binding protein	ERBP	n.s.	4.69	<0.0001	▲	4.69	<0.0001
Collagen, type I, alpha 1	COL1A1	▲	3.69	<0.0001	▲	3.72	<0.0001
Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	n.s.	2.68	<0.0001	▲	2.55	<0.0001
Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	RRM2	▲	2.03	<0.0009	▲	2.5	<0.0001
Deoxyribonuclease I-like 3	DNASE1L3	n.s.	1.86	<0.0001	▲	1.57	<0.0002
Collagen, type V, alpha 2	COL5A2	▲	1.51	<0.002	▲	1.44	<0.0004
Jagged 1 (Alagille syndrome)	JAG1	▼	-0.79	<0.0024	▼	-0.69	<0.0001
Claudin8	CLDN8	n.s.	-1.44	<0.0001	▼	-1.00	<0.92
RAR-related orphan receptor C	RORC	n.s.	-0.87	<0.7	▼	-1.09	<0.64
Cold inducible RNA binding protein	CIRBP	n.s.	-1.73	<0.005	▼	-1.27	<0.045
Zinc finger protein G77	ZNF677	n.s.	-1.06	<0.05	▼	-1.43	<0.0001
Eukaryotic elongation factor-2 kinase	EEF2K	n.s.	-4.94	<0.0002	▼	-1.72	<0.02
Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	NOL3	▼	-3.31	<0.0001	▼	-1.90	<0.0001
Metallothionein 1X	MT1X	▼	-1.44	<0.0001	▼	-1.98	<0.0001
Glucosidase, beta, acid	GBA/GBAP	n.s.	-3.03	<0.0001	▼	-2.1	<0.0002
Ephrin-A1	EFNA1	n.s.	-2.09	<0.0004	▼	-2.74	<0.0001
Late envelope protein 7	LEP7	▼	-4.00	<0.0001	▼	-3.37	<0.0001
Plasma membrane proteolipid (plasmalogen)	PLP	▼	-1.43	<0.0001	▼	-3.42	<0.0001
Keratin 1B	KRT1B	n.s.	-3.00	<0.0001	▼	-3.69	<0.0001
Small proline-rich protein 2G	SPRR2G	▼	-4.68	<0.0001	n.s.	-5.05	<0.0001

^a Fold-change above or below control; value of fold-change between the start and end of treatment with placebo vs. fold-change between the start-end of treatment in the indicated DHEA group.

(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) in 50 µl final volume as described [22]. Gene-specific primers were designed by GeneTools software (Biotools Inc.). The sequences of primers used are shown in Table 1.

The RT reaction was performed at 50 °C for 2 h, followed by a 30 min at 37 °C incubation with RNaseA and a final purification by column (QIAGEN, Valencia, CA).

RT-PCR quantitative assays was run in triplicates using the LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBRGreen I kit (Roche Diagnostics) following the manufacturer's recommendations. PCR was performed using LightCycler (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) for 50 cycles of 95 °C for 10 s (denaturation), 59–65 °C for 5 s (annealing), 72 °C for 10–12 s (elongation), and at 78 °C for 3 s (lecture). The housekeeping gene *Atp5o* was used as a reference gene. Amplification specificity was checked using a melting curve following the manufacturer's instructions. Quantification was obtained using the second derivative calculation and double correction [22], and the results were analyzed with LightCycler Software v.3.5 (Roche).

3. Results

3.1. Microarray data analysis of DHEA effect on human skin transcriptome

Sixty-six probe sets corresponding to 52 well-characterized genes (represented by one or more probe sets) (Table 2) and 9 unknown sequences (EST) (data not shown) were significantly modulated ($p < 0.05$) by DHEA. Global analysis of the increased gene expression levels under the influence of DHEA showed a clear over-representation of genes associated with transcription regulation, cell proliferation and keratinocyte differentiation. Of note, the expression of extracellular matrix structural molecules, including several members of the collagen family, was stimulated by DHEA. Clearly, DHEA treatment affected both compartments of human skin present in the biopsies, i.e. epidermis and dermis.

3.2. DHEA increases the expression of several members of the collagen gene family

Among the genes up-regulated by DHEA, a dose-dependent increase in the expression of probe sets corresponding to several members of the collagen family was observed (Fig. 1). The highest level of modulation was observed for COL1A1 and A2, COL3A1 as well as the COL5A1 and A2 genes after 2% DHEA treatment (Fig. 1). Interestingly, an up-regulation of a key gene involved in the synthesis of the extracellular matrix (ECM), namely secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) was also observed (Fig. 1).

3.3. DHEA modulates the expression of several genes involved in keratinocyte proliferation and differentiation

Among the genes up-regulated by DHEA, we found several genes encoding proteins involved in host defense and generally detected in the upper layers of the epidermis, including Serpins B3 (SCCA-1) and B4 (SCCA-2), S100A8 and A9 (Table 2 and Fig. 2). A whole set of genes linked to DNA remodeling and cell proliferation was also up-regulated (Table 2). On the other hand, the Small Proline-Rich Protein 2G (SPRR2G) and S100 calcium binding protein P (S100P) (Fig. 2) and Keratin 1B genes (Table 2) were down-regulated by DHEA. Additionally, desmosome-associated corneodesmosin (Cdsn), a late marker of terminal differentiation of keratinocytes [23,24] as well as Claudin-8 (Tables 2 and 3) were also down-regulated in the group of DHEA 2% measured after 8 weeks of treatment. Finally, the expression of two other genes involved in terminal differentiation of keratinocytes, namely the Late envelope protein 7 (LEP7) and the Jagged 1 (JAG1) genes, were also down-regulated by DHEA (Fig. 3).

Due to the small amount of RNA obtained from 2 mm biopsies, only 24 genes were selected for RT-PCR validation. The RT-PCR data show that the level of stimulation/repression of the selected genes agrees with the microarray data for at least one of the two highest concentrations of DHEA tested (1% or 2% DHEA) (Table 3). For

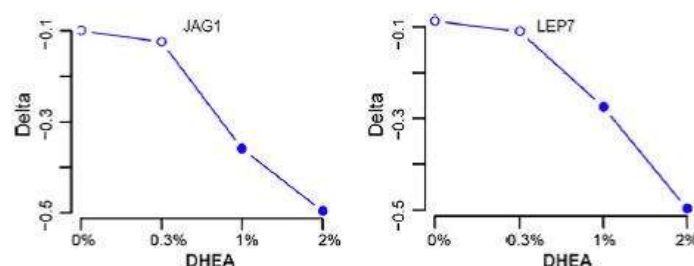


Fig. 3. DHEA down-regulation of JAG1 and LEP7 gene expression. Data are expressed as raw signal intensity after normalization by the RMA method. Fold-change values (pre- and post-treatment) are expressed as \log_2 (Delta). Filled dots correspond to a statistically significant difference ($p < 0.05$).

example, we have indeed found a progressive increase of SPARC mRNA, starting at 0.3% DHEA (Fig. 1), and confirmed by RT-PCR, for the groups 1% and 2% DHEA (Table 3). In addition, down-regulation of keratinocyte differentiation was also confirmed as LEP-7 in the 1% DHEA group as well as SPRR2G, in the 2% DHEA group measured after 8 weeks of treatment. On the whole, only 2 out of 25 gene changes were not validated by RT-PCR (i.e. KNTCL2 and RORC).

Altogether, these results show that, in response to DHEA treatment, the balance between epidermal proliferation and differentiation is modified in favor of proliferation, while structural dermal genes are activated.

4. Discussion

The present study is the first comprehensive analysis and characterization of the changes induced by DHEA in the transcription profile of the whole genome in human skin. Such an approach is likely to provide significant insights into the potential role of DHEA in skin aging.

The thinning and wrinkling of the skin [25] and the loss of skin elasticity and firmness [26] are believed to be caused by decreased collagen synthesis and increased collagen degradation [27]. Considering that the dermis predominantly contains type I and III collagens (85–90% and 10–15% of total proteins, respectively), the alterations of collagen are thus believed to be the causes of clinical changes during aging, especially skin wrinkles and loss of elasticity [28,29].

With increasing age, a decrease in collagen biosynthesis is observed, concomitant with increased collagen degradation by matrix metalloproteinases (MMP) [30]. In fact, collagen content has been shown to decrease 2% per postmenopausal year [31]. In agreement with these observations, collagen types I and III are believed to have decreased by as much as 30% 5 years after menopause [32,33]. In addition, a reduction in the type III/type I ratio is observed in the dermis at menopause [33].

Some effects of DHEA on collagen gene expression and protein synthesis have already been described. For example, DHEA increased human $\alpha 1$ (s) procollagen and reduced collagenase (MMP-2) gene expression in cultured skin fibroblasts [34], while in human skin, DHEA treatment up-regulated procollagen type I and TIMP-1 expression and down-regulated MMP-1 [16]. Here we show that in whole human skin, DHEA indeed stimulates the expression of not only COL1A1, COL1A2 but also other members of the family of collagen genes, namely COL3A1 and COL5A2. Interestingly, the co-stimulation of both COL1A1 and COL1A2 genes suggest that common cis-acting elements are present on both genes [35] and modulated in parallel in human skin by DHEA.

In fact, in most tissues, type III collagen is co-expressed with type I collagen and, under physiological conditions, the amount of collagen III regulates the diameter of type I collagen fibrils, thus

controlling the mechanical characteristics of the tissue [36,37]. In addition, collagen V is a quantitatively minor component of most connective tissues that are rich in collagen I fibrils. On the other hand, both collagens I and V co-polymerize to form heterotypic fibrils. In analogy with collagen III, it has been suggested that collagen V could serve as a negative regulator of collagen I fibril diameter (reviewed by Fichard et al. [38]). Finally, together with COL1A1 and A2, COL3A1, COL5A1 and A2, SPARC expression was also stimulated by DHEA treatment. Accordingly, a remarkable parallelism (see Fig. 1) was observed between the expression of SPARC and almost all mRNAs encoding collagens which bind this glycoprotein, namely COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1 and COL5A2.

Since SPARC is known to be required for collagen deposition and collagen fiber maturation in the dermal ECM, the synthesis of the ECM particularly during matrix remodeling [39] and the maintenance of skin mechanical strength [40], the co-stimulatory effect of DHEA on COL1, COL3, COL5 and SPARC expression could result into a remodeling of dermis architecture and increased firmness of the skin. Interestingly, these up-regulated genes are also detected during the repair process of wound healing [41]. Their DHEA-induced up-regulation thus suggests that DHEA-treated skin could share some features with wound healing skin, linked to keratinocyte proliferation and delayed differentiation.

For example, S100A8 and S100A9, also known as calgranulin A or MRP8 and calgranulin B or MRP14, respectively, are two additional genes that are up-regulated by topical treatment with DHEA. These components are the most abundant naturally occurring homo- and heterodimers of the S100 family [42]. Interestingly, their expression is increased during epidermal repair [43] and the hyperproliferative phase of wound healing [44]. In line with this, DHEA treatment also decreases significantly the levels of Keratin 1, a well known marker of early differentiation of keratinocytes [45,46], as well as SPRR2G, a member of the SPRRs family preferentially expressed in the suprabasal cells of keratinized epithelia, and localized essentially in the spinous cells [47,48].

In addition to the above-mentioned early differentiation markers, we have found that desmosome-associated corneodesmosin (Cdsn), another late marker of terminal differentiation of keratinocytes [23,24], is also down-regulated in the group of 2% DHEA examined after 8 weeks of treatment. Claudins, like Cdsn, are located in the cells of the granular layer of the epidermis, and colocalize into tight junctions (TJs) with TJs plaque proteins and occludins [49]. The present study shows that claudin-8 expression is also down-regulated by DHEA treatment, together with two other genes involved in keratinocyte terminal differentiation, namely Jagged 1 (JAG1) and LEP7. JAG1 is one of the mediators of the Notch signaling pathway [50], sufficient to trigger terminal differentiation and corneogenesis in a living human epidermal equivalent model system [51]. LEP7, also identified as Chromosome 1 open-reading frame 68 (C1orf68), or Human skin-specific protein (xp32

gene) [52] is induced during keratinocyte terminal differentiation and relocates to the envelope very late in terminal differentiation. The concomitant down-regulation of JAG1, LEP7, Claudin-8, Cdsn, SPRR2G, all genes associated with the late keratinocyte differentiation and cornification process, may indicate that the effect of DHEA on epidermis could be mediated by a delay in keratinocyte differentiation, reducing the transition rate from spinous to granular cell and ultimately the production of the cornified component of the skin.

Interestingly, several genes modulated by DHEA like S100A8, S100A9, SPRR2G and LEP7 are co-localized in the Epidermal Differentiation Cluster (EDC) on human chromosome 1q21 [53], which unites a remarkable number of functionally related genes that play an important role in terminal differentiation of the human epidermis [54]. Further studies will however be necessary to assess the real impact of DHEA in keratinocyte differentiation, and ultimately, in skin barrier properties.

Finally, almost all genes modulated by 1% DHEA after 12 weeks were also modulated in the same way by 2% DHEA after 8 weeks of treatment. Additionally, all the genes significantly modulated only by 2% DHEA but non-significantly changed by 1% DHEA, were found significantly modulated when a more sensitive method, namely RT-PCR, was used with the same samples (Tables 2 and 3). Moreover, certain genes, especially the collagen genes and members of the SERPIN family appear very sensitive at the lowest dose of DHEA used (Figs. 1 and 2, respectively). These observations could suggest that topical DHEA may trigger genomic changes in the skin even at low doses (0.3% DHEA) and that the effect of high doses (2% DHEA) may be reached by lower doses after longer exposure time.

Taken together, the present data suggest that DHEA could counteract the effect of aging by acting simultaneously on both skin compartments namely the dermis, by stimulating collagen biosynthesis and deposition, and in the epidermis by modulating keratinocyte proliferation and differentiation. Some of the effects observed are reminiscent of wound healing, thus suggesting that DHEA treatment could potentially lead to apparent skin rejuvenation. It is recognized that the skin undergoes regressive changes after menopause and that these changes are mainly related to a loss of skin collagen content. The present data suggest that DHEA could exert anti-aging effects in the skin, secondary to DHEA-induced changes in the structural organization of the dermis.

Conflicts of interest

None declared.

References

- [1] M. Samuel, R.C.C. Brooke, S. Hollis, C.E.M. Griffiths, Interventions for photodamaged skin, *Cochrane Database System Rev* (2005), CD001782, doi:10.1002/14651858.CD001782.pub2.
- [2] C. Labrie, A. Bélanger, F. Labrie, Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate, *Endocrinology* 123 (1988) 1412–1417.
- [3] F. Labrie, *Intracrinology, Mol. Cell. Endocrinol.* 78 (1991) C113–C118.
- [4] F. Labrie, V. Luu-The, A. Bélanger, S.-X. Lin, J. Simard, C. Labrie, Is DHEA a hormone? Starling review, *J. Endocrinol.* 187 (2005) 169–196.
- [5] F. Labrie, A. Bélanger, P. Bélanger, R. Bérubé, C. Martel, L. Cusan, J.L. Gomez, B. Candas, I. Castiel, V. Chaussade, C. Deloche, J. Leclaire, Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99 (2006) 182–188.
- [6] Women's Health Initiative, Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women, *JAMA* 288 (2002) 321–333.
- [7] V. Beral, D. Bull, G. Reeves, Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study, *Lancet* 365 (2005) 1543–1551.
- [8] F. Labrie, V. Luu-The, C. Labrie, G. Pelletier, M. El-Alfy, *Intracrinology and the skin, Horm. Res.* 54 (2000) 218–229.
- [9] R. Hoffman, S. Niyama, A. Huth, S. Kissling, R. Happle, 17 α -estradiol induces aromatase activity in intact human anagen hair follicles ex vivo, *Exp. Dermatol.* 4 (2002) 376–380.
- [10] S. Gingras, C. Turgeon, N. Brochu, F. Labrie, J. Simard, Characterization and modulation of sex steroid metabolizing activity in normal human keratinocytes in primary culture and haccat cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87 (2003) 167–179.
- [11] F. Labrie, V. Luu-The, C. Labrie, A. Bélanger, J. Simard, S.-X. Lin, G. Pelletier, Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone, *Endocr. Rev.* 24 (2003) 152–182.
- [12] F. Labrie, P. Diamond, L. Cusan, J.L. Gomez, A. Bélanger, B. Candas, Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 3498–3505.
- [13] E.E. Baulieu, G. Thomas, S. Legrain, N. Lahlou, M. Roger, B. Debuire, V. Faucouneau, L. Girard, M.P. Hervy, F. Latour, M.C. Leaud, A. Mokrane, H. Pitti-Ferrandi, C. Trivaille, O. de Lacharriere, S. Nouveau, B. Rakoto-Arison, J.C. Souberbielle, J. Raison, Y. Le Bouc, A. Raynaud, X. Girerd, F. Forette, Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 4279–4284.
- [14] K. Sakyo, A. Ito, Y. Mori, Effects of dehydroepiandrosterone sulphate on the production of collagenase and gelatinolytic metalloproteinase by rabbit uterine cervical cells in primary cultures, *J. Pharmacobiodyn.* 9 (1986) 276–286.
- [15] K. Yoshida, R. Tahara, T. Nakayama, T. Yanai, Effect of dehydroepiandrosterone sulphate, oestrogens and prostaglandins on collagen metabolism in human cervical tissue in relation to cervical ripening, *J. Int. Med. Res.* 21 (1993) 26–35.
- [16] M.H. Shin, G.E. Rhie, C.H. Park, K.H. Kim, K.H. Cho, H.C. Eun, J.H. Chung, Modulation of collagen metabolism by the topical application of dehydroepiandrosterone to human skin, *J. Invest. Dermatol.* 124 (2005) 315–323.
- [17] F. Labrie, V. Luu-The, E. Calvo, C. Martel, J. Cloutier, S. Gauthier, P. Belleau, H. Boucher, J. Morissette, M.H. Lévesque, C. Labrie, Tetrahydrogestrone (THG) induces a genomic signature typical of a potent anabolic steroid, *J. Endocrinol.* 184 (2) (2005) 427–433.
- [18] F. Labrie, V. Luu-The, C. Martel, A. Chernomoretz, E. Calvo, J. Morissette, C. Labrie, DHEA is an anabolic steroid like testosterone and THG, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 100 (2006) 52–58.
- [19] L. Gautier, L. Cope, B.M. Bolstad, R.A. Irizarry, Affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level, *Bioinformatics* 20 (2004) 307–315.
- [20] R.A. Irizarry, B. Hobbs, F. Collin, Y.D. Beazer-Barclay, K.J. Antonellis, U. Scherf, T.P. Speed, Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data, *Biostatistics* 4 (2003) 249–264.
- [21] J.M. Wettenhall, K.M. Simpson, K. Satterley, G.K. Smyth, AffyGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data, *Bioinformatics* 22 (2006) 897–899.
- [22] V. Luu-The, G. Pelletier, F. Labrie, Quantitative appreciation of steroidogenic gene expression in mouse tissues: new roles for type 2 5 α -reductase, 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase and estrogen sulfotransferase, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93 (2005) 269–276.
- [23] M. Simon, N. Jonca, M. Guerrin, M. Haftek, D. Bernard, C. Caubet, T. Egelrud, R. Schmidt, G. Serre, Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20292–20299.
- [24] N. Jonca, M. Guerrin, K. Hadjiolova, C. Caubet, H. Gallinaro, M. Simon, G. Serre, Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5024–5029.
- [25] C.Y. Tan, B. Statham, R. Marks, P.A. Payne, Skin thickness measurement by pulsed ultrasound: its reproducibility, validation and variability, *Br. J. Dermatol.* 106 (1982) 657–667.
- [26] F. Henry, C. Pierard-Franchimont, G. Cauwenbergh, G.E. Pierard, Age-related changes in facial skin contours and rheology, *J. Am. Geriatr. Soc.* 45 (1997) 220–222.
- [27] G.J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, J.J. Voorhees, Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, *Arch. Dermatol.* 138 (2002) 1462–1470.
- [28] G.J. Fisher, Z.Q. Wang, S.C. Datta, J. Varani, S. Kang, J.J. Voorhees, Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 1419–1428.
- [29] J. Varani, R.L. Warner, M. Gharraee-Kermani, S.H. Phan, S. Kang, J.H. Chung, Z.Q. Wang, S.C. Datta, G.J. Fisher, J.J. Voorhees, Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin, *J. Invest. Dermatol.* 114 (2000) 480–486.
- [30] G.J. Fisher, S.C. Datta, H.S. Talwar, Z.Q. Wang, J. Varani, S. Kang, J.J. Voorhees, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature* 379 (1996) 335–339.
- [31] M. Brincat, E. Versi, C.F. Moniz, A. Magos, J. de Trafford, J.W. Studd, Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy, *Obstet. Gynecol.* 70 (1987) 123–127.
- [32] M. Brincat, C.J. Moniz, J.W. Studd, A. Darby, A. Magos, G. Emburey, E. Versi, Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 92 (1985) 256–259.
- [33] P. Affinito, S. Palomba, C. Sorrentino, C. Di Carlo, G. Bifulco, M.P. Arienzo, C. Nappi, Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen, *Maturitas* 33 (1999) 239–247.

- [34] K.S. Lee, K.Y. Oh, B.C. Kim, Effects of dehydroepiandrosterone on collagen and collagenase gene expression by skin fibroblasts in culture, *J. Dermatol. Sci.* 23 (2000) 103–110.
- [35] G. Karsenty, R.W. Park, Regulation of type I collagen genes expression, *Int. Rev. Immunol.* 12 (1995) 177–185.
- [36] X. Liu, H. Wu, M. Byrne, S. Krane, R. Jaenisch, Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 1852–1856.
- [37] K. Stevenson, U. Kucich, C. Whitbeck, R.M. Levin, P.S. Howard, Functional changes in bladder tissue from type III collagen-deficient mice, *Mol. Cell. Biochem.* 283 (2006) 107–114.
- [38] A. Fichard, J.P. Kleman, F. Ruggiero, Another look at collagen V and XI molecules, *Matrix Biol.* 14 (1995) 515–531.
- [39] J.P. Alexander, J.R. Samples, E.M. Van Buskirk, T.S. Acott, Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human trabecular meshwork, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32 (1991) 172–180.
- [40] A.D. Bradshaw, P. Puolakkainen, J. Dasgupta, J.M. Davidson, T.N. Wight, E. Helene Sage, SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength, *J. Invest. Dermatol.* 120 (2003) 949–955.
- [41] I. Hopkinson, W. Evans, D. Chant, S. Hiscox, D. Berry, K. Harding, Reverse transcription-polymerase chain reaction detection of collagen transcripts in healing human wounds, *Eur. J. Clin. Invest.* 25 (1995) 539–542.
- [42] R.L. Eckert, A.M. Broome, M. Ruse, N. Robinson, D. Ryan, K. Lee, S100 proteins in the epidermis, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 23–33.
- [43] C. Marionnet, F. Bernerd, A. Dumas, F. Verrecchia, K. Mollier, D. Compan, B. Bernard, M. Lahfa, J. Leclaire, C. Medaiko, B. Mehul, S. Seite, A. Mauviel, L. Dubertret, Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress in vivo, *J. Invest. Dermatol.* 121 (2003) 1447–1458.
- [44] I.S. Thorey, J. Roth, J. Regenbogen, J.P. Halle, M. Bittner, T. Vogl, S. Kaesler, P. Bugnon, B. Reitmaier, S. Durka, A. Graf, M. Wockner, N. Rieger, A. Konstantinow, E. Wolf, A. Goppelt, S. Werner, The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 35818–35825.
- [45] H. Green, E. Fuchs, F. Watt, Differentiated structural components of the keratinocyte, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46 (Pt 1) (1982) 293–301.
- [46] S.H. Yuspa, A.E. Kilkenny, P.M. Steinert, D.R. Roop, Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro, *J. Cell. Biol.* 109 (1989) 1207–1217.
- [47] M. Hwang, A. Kalinin, M.I. Morasso, The temporal and spatial expression of the novel Ca²⁺-binding proteins, Scarf and Scarf2, during development and epidermal differentiation, *Gene Expr. Patterns* 5 (2005) 801–808.
- [48] E.B. Lane, Keratins, in: P.M. Royce, B.U. Steinmann (Eds.), *Connective Tissue and its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*, Wiley-Liss, New York, 1993, pp. 237–247.
- [49] J.M. Brandner, S. Kief, C. Grund, M. Rendl, P. Houdek, C. Kuhn, E. Tschachler, W.W. Franke, I. Moll, Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes, *Eur. J. Cell. Biol.* 81 (2002) 253–263.
- [50] C.E. Lindsell, C.J. Shawber, J. Boulter, G. Weinmaster, Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1, *Cell* 80 (1995) 909–917.
- [51] B.J. Nickoloff, J.Z. Qin, V. Chaturvedi, M.F. Denning, B. Bonish, L. Miele, Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma, *Cell. Death Differ.* 9 (2002) 842–855.
- [52] X.P. Zhao, J.T. Elder, Positional cloning of novel skin-specific genes from the human epidermal differentiation complex, *Genomics* 45 (1997) 250–258.
- [53] A.P. South, A. Cabral, J.H. Ives, C.H. James, G. Mirza, I. Marenholz, D. Mischke, C. Backendorf, J. Ragoussis, D. Nizetic, Human epidermal differentiation complex in a single 2.5 Mbp long continuum of overlapping DNA cloned in bacteria integrating physical and transcript maps, *J. Invest. Dermatol.* 112 (1999) 910–918.
- [54] D. Mischke, B.P. Korge, I. Marenholz, A. Volz, A. Ziegler, Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21, *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 989–992.

Skin responses to topical dehydroepiandrosterone: implications in antiageing treatment?

M. El-Alfy, C. Deloche,* L. Azzi, B.A. Bernard,* F. Bernerd,* J. Coutet,* V. Chaussade,* C. Martel, J. Leclaire* and F. Labrie

Molecular Endocrinology, Oncology and Human Genomics Research Center, Laval University Hospital Research Center (CRCHUL) and Laval University, 2705 Laurier Boulevard, Quebec City, G1V 4G2 QC, Canada

*L'Oréal Recherche, Centre Charles Zviak, 92 583 Clichy, France

Summary

Correspondence

F. Labrie.

E-mail: fernand.labrie@endoceutics.com

Accepted for publication

27 July 2010

Key words

androgen receptor, DHEA, menopause, skin

Conflicts of interest

None declared.

The first two authors contributed equally.

DOI 10.1111/j.1365-2133.2010.09972.x

Background Although low dehydroepiandrosterone (DHEA) is suspected to have a role in skin ageing, little information is available on the mechanisms potentially involved.

Objectives To obtain information on androgen receptor (AR) and procollagen expression in ageing skin during DHEA treatment.

Methods A placebo-controlled, randomized, prospective study was performed with 75 postmenopausal women aged 60–65 years. The women were treated twice daily for 13 weeks with 3.0 mL of placebo or 0.1%, 0.3%, 1% or 2% DHEA cream applied on the face, arms, back of hands, upper chest and right thigh where 2-mm biopsies were collected before and after treatment.

Results Although the overall structure of the epidermis was not significantly affected at the light microscopy level, AR expression examined by immunocytochemistry was markedly increased by DHEA treatment. In the dermis, the expression levels of procollagen 1 and 3 mRNA estimated by *in situ* hybridization were increased by DHEA treatment. In addition, the expression of heat shock protein (HSP) 47, a molecule believed to have chaperone-like functions potentially affecting procollagen biosynthesis, was also found by immunocytochemistry evaluation to be increased, especially at the two highest DHEA doses.

Conclusion These data suggest the possibility that topical DHEA could be used as an efficient and physiological antiageing skin agent.

During the past two decades, much attention has been given to skin physiology and the role of hormones in this tissue. Indeed, this largest organ of the human body represents the most visible reflection of our well-being and good health. Today, more than ever, preventing or repairing the damages of skin ageing is a major objective worldwide. With ageing, especially during the postmenopausal years, women are very concerned by the overwhelming skin modifications.¹ In fact many dermatological signs and symptoms are associated with menopause, such as increased skin dryness, loss of elasticity and firmness, and the appearance of wrinkles. During this period, the well-known decrease in steroid production, especially in women² is believed to accelerate skin changes.^{3–5}

With age, the progressive and marked decrease in the secretion of dehydroepiandrosterone (DHEA),^{6–9} the most abundant sex steroid circulating in humans, is believed to play an important role in many problems associated with menopause and ageing. A number of animal and human studies have

shown beneficial effects of DHEA in a series of age-related changes such as obesity,^{10,11} diabetes¹² and atherosclerosis.¹³ In addition, the beneficial effects of DHEA have been observed on several problems occurring in postmenopausal women, especially vaginal atrophy,^{14–16} bone loss, skin atrophy, muscle loss, adiposity, insulin resistance and well-being after oral and/or percutaneous administration of DHEA.^{8,13–21} Concerning skin atrophy, it has been shown in preclinical models that DHEA has specific effects on the different skin layers and appendages; this steroid precursor induces dermal thickening in gonadectomized mice,²² increases the number and size of sebaceous glands in ovariectomized (OVX) female rats²³ and accelerates cutaneous wound healing in OVX female Balb/c mice.²⁴

Several cell types present in the compartments of human skin, namely the epidermis, dermis, sebaceous glands and sweat glands are known to be androgen sensitive and express the steroidogenic enzymes required to transform DHEA into

dihydrotestosterone (DHT).^{25–27} Thus, in postmenopausal women, after cessation of oestrogen secretion by the ovaries, practically all active sex steroids are synthesized in peripheral tissues from DHEA and DHEA sulphate from an adrenal origin.^{8,25,26} An increase in serum DHEA and its metabolites is known to occur after percutaneous administration of DHEA in postmenopausal women.^{19,28} Moreover, it was observed that the transformation of DHEA reaches a plateau at serum levels below those observed in premenopausal women.²⁸

Previous *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that DHEA is involved in the regulation of collagen and extracellular matrix metalloproteinase synthesis in human skin.^{29,30} To investigate whether or not increased circulating DHEA levels could produce skin modifications in postmenopausal women, a large transcriptomic study using Affymetrix microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) was performed.³⁰ It was shown that topical treatment with DHEA modulates the expression of several dermal and epidermal genes. In the present study, we used immunocytochemistry and *in situ* hybridization to investigate further the dermal and epidermal morphological changes in gene expression induced by DHEA application on the skin.

Materials and methods

Subjects and sample preparation

Seventy-five healthy postmenopausal white women aged 60–65 years participated in this study after institutional review board approval and having signed informed consent. None of the women had received any hormone replacement therapy for at least the last 6 months before the beginning of the study. No subject was under treatment with lipid- or glucose-lowering agents. There was no active or history of thromboembolic disease, significant metabolic or endocrine disease and no clinically significant gastrointestinal, liver or gall-bladder disease. None of the women suffered from migraine or diabetes mellitus not controlled by conventional therapy. None had received corticosteroid treatment within the last 6 weeks before the beginning of the study or treatment with β -carotenoid, retinoic acid, hydroquinone or α -hydroxyacid (including inhaled, topical or oral). None of the women suffered hypertension $\geq 160/95$ mmHg or not controlled by standard therapy, confirmed clinically significant depression or confirmed severe psychiatric disturbance. None of the women had received any experimental drug within the 30 days before the screening visit or any previous treatment with androgens or anabolic steroids within the 6 months before the screening visit. None had received any antidepressant, antipsychotic or analgesic within 30 days before the beginning of the study. Smoking any number of cigarettes was an exclusion criterion. There was no former or present narcotic addiction or alcoholism. The body mass index of all women ranged between 18.5 and 29.9 kg m⁻². There was no hepatic or renal impairment or condition known to affect drug or steroid metabolism. All subjects had a medical history, complete physical examination, serum biochemistry as well as full blood analysis.

Each subject was randomly assigned to one of the following five groups: 0% DHEA (placebo), 0.1% DHEA, 0.3% DHEA, 1% DHEA and 2% DHEA. Daily, before breakfast, and after supper, for 13 weeks, subjects received 3.0 mL of one of the five emulsions. All subjects were instructed to apply the study treatment twice daily (in the morning between 06:00 h and 09:30 h and in the evening between 18:00 h and 21:30 h) during 13 weeks. The first emulsion application was supervised and instructions were provided to all women. The emulsion (0.3 mL) was applied to the forehead including 2 cm past the hair line, 0.3 mL was applied to the face (right side), 0.3 mL on the back of each arm, 0.3 mL on the back of the right hand, 0.3 mL on the upper chest, 2 \times 0.3 mL on the right thigh (external face) and 0.3 mL each on the external face of the right and left legs for a total dose of 3.0 mL of emulsion two times per day.

Two biopsies were obtained from the thigh of each woman, one before and the second after the end of treatment. Biopsies were taken from the external face of the thighs located at 8 cm below the trochanter on a vertical line using the right or left side (left or right side depending on randomization) after either 7 or 13 weeks of treatment (Table 1). To collect the punch biopsies, local anaesthesia was used, and a 2-mm diameter cylindrical core of skin was removed.

Tissue processing

Immediately after collection, the 2-mm diameter biopsies were fixed in 4% paraformaldehyde for 12 h. The material was then embedded in paraffin blocks from which 4- μ m sections were cut.

Immunohistochemistry

General procedure for immunochemistry and scoring evaluation

Immunostaining was performed using Zymed SP kits (San Francisco, CA, U.S.A.). Paraffin sections (4 μ m) were deparaffinized in toluene and rehydrated through graded ethanol. Endogenous peroxidase activity was eliminated by preincubation with 3% H₂O₂ in methanol for 30 min and, if needed, an antigen retrieval technique was used (see below). After cooling the slides, nonspecific binding sites were blocked using 10% goat serum for 20 min. Sections were then incubated with their respective primary antibody (see below) and then washed in PBS buffer and incubated with goat biotinylated secondary antibody (Zymed SP kits) for 10 min and thereafter with the streptavidin–peroxidase complex (Zymed SP kit) for another 10 min. Under monitoring by microscope, diaminobenzidine was used as the chromogen to visualize the biotin/streptavidin–peroxidase complex. If applicable, counterstaining was performed using no. 2 Gill's haematoxylin for 30 s.

Evaluation of the labelling intensity and of the number of labelled cells or nuclei was performed blindly and independently by two investigators. For each subject, sections

Table 1 Subject enrolment and biopsies

Treatment	Number of subjects at day 1	Number of subjects biopsied and timing during treatment	Total number of biopsies performed (day 1 and week 7 or week 13)	Withdrawals without biopsy
Placebo	15	15 at week 13	29 ^a	None
0.1% DHEA	15	13 at week 13	26 ^b	1 at week 4 (skin problem) 1 at week 8 (keratosis)
0.3% DHEA	15	15 at week 13	30	None
1% DHEA	15	10 at week 13 5 at week 7	30	5 at week 7 (serum levels of DHEA above 11 ng mL ⁻¹)
2% DHEA	15	3 at week 13 10 at week 7	26 ^b	1 at day 6 (contact dermatitis) 1 at week 4 (contact dermatitis) 10 at week 7 (serum levels of DHEA above 11 ng mL ⁻¹)

^aOne biopsy missing at enrolment. ^bTwo withdrawals without biopsy. DHEA, dehydroepiandrosterone.

of biopsies before and after treatment were examined and compared under a bright-field microscope and according to the change after treatment, a score was recorded.

Antibodies

Androgen receptor A microwave antigen retrieval technique using 0.01 mol L⁻¹ citrate buffer was applied for 15 min.³¹ After cooling the slides, sections were incubated for 90 min at room temperature with androgen receptor (AR) antibody (N-20, cat. no. SC-816; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.; diluted 1 : 150). A qualitative evaluation of the number of labelled epidermal cell nuclei and their staining intensity were compared between the two biopsies before and after treatment. A score ranging from 1 to 3 was recorded for all the subjects: (1) no obvious change; (2) moderate increase; and (3) a strong increase in the number of labelled nuclei and/or their staining intensity after treatment.

Heat shock protein After the microwave technique, sections were incubated for 90 min at room temperature with heat shock protein (HSP) 47 mouse monoclonal antibody (cat. no. SPA-470; Stressgen Bioreagents, Victoria, BC, Canada; diluted 1 : 150). As for AR, evaluation of the staining intensity and/or the number and size of labelled fibroblasts was performed by scores ranging from 1 to 3.

In situ hybridization

Preparation of probes

Labelled sense and antisense cRNA probes were synthesized by incubation of linearized template (2 µg) with 63 µCi [³⁵S]UTP (1250 Ci mmol L⁻¹; NEN, Billerica, MA, U.S.A.) in the presence of T7 or T3 RNA polymerase for 60 min at 37 °C, according to the manufacturer's recommendations (Riboprobe Combination System, Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.).

Hybridization

After deparaffinization and rehydration, skin sections were treated with proteinase K [1 µg mL⁻¹ in 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8), 50 nmol L⁻¹ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), (pH 8.0)] for 30 min at 37 °C and with anhydrous acetic acid (0.25%) for 10 min. After dehydration and drying of the sections, a prehybridization buffer [60% formamide, 0.35 mol L⁻¹ NaCl, 12 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8), 1 mmol L⁻¹ EDTA, 400 µg mL⁻¹ tRNA, 1.2 × Denhardt's solution and 12% dextran sulphate] was applied on the sections for 2 h at room temperature, followed by the hybridization buffer containing the antisense probe (prehybridization buffer plus 50 nmol L⁻¹ dithiothreitol and 2 × 10⁶ c.p.m. of ³⁵S-labelled RNA per slide) for an overnight incubation at 53 °C. To remove the excess probe, the sections were washed twice in 50% formamide, 2 × SSC at 58 °C for 90 min and with RNase A treatment (20 µg mL⁻¹ for 30 min at 37 °C) between the two previous washes. The slides were then dehydrated in graded alcohol, air-dried, and later dipped in a photographic emulsion (IM-1; Amersham Biosciences, Amersham, U.K.) and exposed in the dark at 4 °C. Slides were developed (D-19 Developer and Rapid Fixer; Kodak, Rochester, NY, U.S.A.) and counterstained with haematoxylin and eosin. The negative control slides were hybridized with the sense probe.

Procollagen type 1/COL1A1

A 49-bp probe was generated from the region 4554–4602 of COL1A1. A first set of slides was developed after 35 days and a second set after 60 days. Scoring and photographs were generally performed using a × 20 lens. Photographs were taken using the dark field, while the bright field was used to verify the localization of the silver grains over the cells. For each subject, sections of biopsies before and after treatment were examined and compared. If no change was observed in the number of fibroblasts and their silver grain labelling intensity, a score of 1 was recorded. If a moderate or high increase was detected, a score of 2 or 3 was recorded, respectively.

Procollagen type 3/COL3A1

A 255-bp probe was generated from the region 3887–4141 of COL3A1. A first set of slides was developed after 27 days and a second set after 40 days. Scoring and photographs were performed exactly as described for procollagen type 1.

Statistical analysis

For each marker, immunostained sections of skin biopsies collected from each subject before and after treatment were examined by two investigators. The treatment effect was recorded as a score value of 1, 2 or 3, corresponding, respectively, to no change, small/moderate or strong change after treatment for each subject. The mean score of the two investigators for each subject was used to calculate the mean score value for each group. Data presented in Figures 1e, 2i, 3i and 4e are expressed as mean and the 25th and 75th percentiles (box plot). For the placebo, 0.1%, 0.3%, 1% and 2% groups, the mean was calculated from score values obtained from the evaluation of 14, 13, 15, 15 and 13 subjects, respectively (see details in Table 1). Statistical significance between each dose and the placebo group was determined according to the multiple-range test of Duncan–Kramer.

Results

As indicated in Table 1, on day 1, 15 subjects were enrolled in the study for each treatment group. At week 13, there were 13–15 subjects per group treated with 0%, 0.1% and 0.3% DHEA. In the 0.1% group, one subject was excluded at week 4 for skin problems, and another at 8 weeks for keratosis. In the 1% and 2% DHEA cream groups, treatment of five and 10 women, respectively, was stopped at 7 weeks due to DHEA serum levels above 11 ng mL^{-1} . In the 2% group, two subjects were excluded for contact dermatitis at day 6 and week 4, respectively. To investigate the impact of topical DHEA treatment on human skin, a histological and morphometric study was undertaken. In addition, as the expression of a number of genes had already been found to be modulated by DHEA topical treatment,³⁰ the fine distribution of their encoded proteins was studied by immunohistology.

Effects of dehydroepiandrosterone on the epidermis

In comparison with the placebo group, DHEA treatment had no significant effect on epidermal thickness, undulation of the dermal–epidermal junction, cell proliferation as assessed by Ki-67 labelling or late differentiation as assessed by filaggrin labelling (data not shown). As DHEA is converted to active sex steroids in peripheral tissues and more specifically in the skin,^{8,25,26} we next investigated the possible effect of DHEA treatment on steroid receptor expression.

Oestrogen nuclear receptor (ER) α -specific staining in the epidermis was faint to null, while a much stronger staining of ER β was observed, in agreement with previous histological

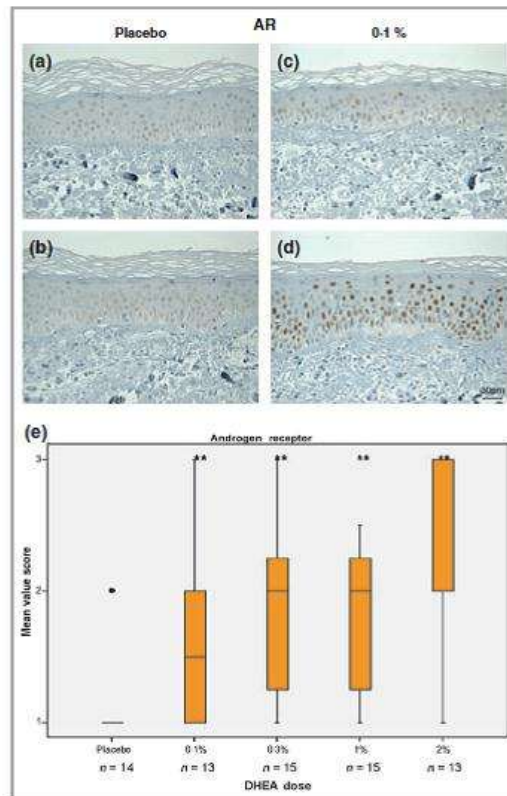


Fig 1. (a–d) Paraffin sections of the epidermis of postmenopausal women immunostained with antiandrogen receptor (AR) antibody. In these representative sections, the AR immunoreactivity was found to be exclusively localized in the majority of the nuclei of epidermal cells. (a) The skin biopsy was collected before the application of the placebo cream; (b) the biopsy was collected 13 weeks after the placebo cream application. The staining intensity and the number of stained nuclei are similar in (a) and (b). (c) The skin biopsy was collected before the application of dehydroepiandrosterone (DHEA) cream; (d) the biopsy was collected 13 weeks after the twice-daily application of 0.1% DHEA cream. The staining intensity and the number of stained nuclei in (d) are clearly higher than in (c). (e) Effect of topical application of DHEA on the expression of AR in the epidermis of postmenopausal women. AR expression increased with the different doses (0.1%, 0.3%, 1% and 2%). All doses showed higher scores (** $P < 0.05$) compared with placebo. Scores are expressed as the mean of the two experts' scores ($n = 70$). Each box represents values between the 25th and 75th percentiles. The horizontal line is the median. The upper bars extend to the largest value, not exceeding the 75th percentile plus $1.5 \times$ the height of the box, while the lower bars extend to the smallest value not below the 25th percentile minus $1.5 \times$ the height of the box. The circle is an outlier.

results.³² In the present study, at no time was ER α - and ER β -specific staining modified by DHEA treatment compared with placebo (data not shown).

AR was expressed in the majority of keratinocytes, exclusively in their nuclei. For each subject in the placebo group, when the staining intensity and the number of stained nuclei

were compared before and after treatment, no significant difference was observed and therefore, a score of 1 (see Materials and methods) was recorded for the majority of subjects of this group. In contrast, in all the other groups who received different DHEA doses (0.1%, 0.3%, 1% and 2%), an increase in AR-staining intensity and in the number of stained nuclei was observed after treatment in the majority of the subjects. Therefore, in all the treated groups, scores higher than 1 were recorded and the results were statistically significant when compared with the placebo group (Fig. 1).

Effects of dehydroepiandrosterone on the dermis

Procollagen type 1/*COL1A1* *in situ* hybridization

In the dermis of skin biopsies hybridized with the (35 S)-labelled *COL1A1* antisense probe, several fibroblasts were

labelled. For each subject in the placebo group, when the silver grain labelling intensity and the number of labelled fibroblasts were compared between the two biopsies before and after treatment, no significant differences were observed and therefore, a score of 1 (see Materials and methods) was recorded for the majority of the subjects of this group. In all the other groups of women who received different DHEA doses (0.1%, 0.3%, 1% and 2%), an increase of the silver grain labelling intensity and number of labelled fibroblasts was observed after treatment in the majority of the subjects. Accordingly, higher scores were recorded and the results were statistically significant when compared with the placebo group (Fig. 2).

Procollagen type 3/*COL3A1* *in situ* hybridization

As observed for procollagen 1, examination of the dermis of the skin biopsies hybridized with the (35 S)-labelled *COL3A1*

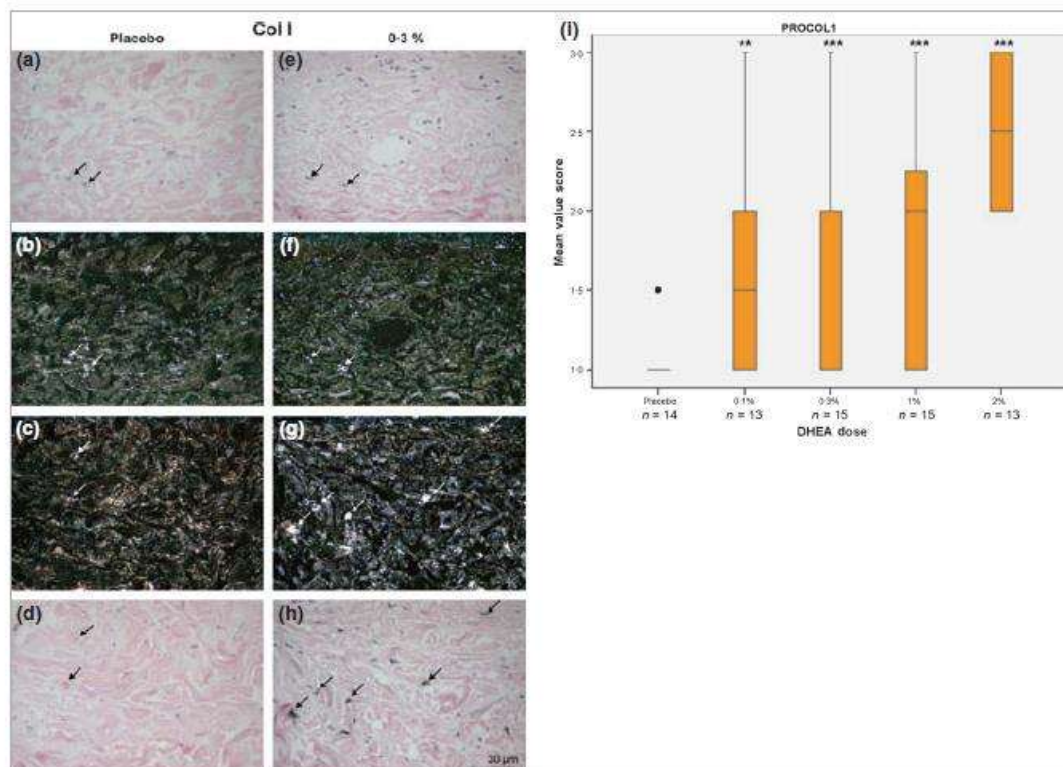


Fig 2. (a-h) Autoradiographs of the dermis of postmenopausal women hybridized with the antisense of the collagen type I cRNA probe. The bright-field photographs show the blue-stained nuclei of the fibroblasts while the dark field of the same photograph indicates the silver grains overlying the fibroblasts (arrows). (a, b) The skin biopsy was collected before the application of the placebo cream; (c, d) the biopsy was collected 13 weeks after placebo cream application. As seen from the photographs (b) and (c), the number of labelled fibroblasts did not increase after the application of the placebo cream. (e, f) The skin biopsy was collected before application of dehydroepiandrosterone (DHEA) cream; (g, h) the biopsy was collected 13 weeks after the application of 0.3% DHEA cream. By comparison of the photographs (f) and (g) and (c) and (h), the number of labelled fibroblasts significantly increased after the 0.3% DHEA cream. (i) Effect of topical application of DHEA on the expression of type 1 procollagen in the dermis of postmenopausal women. At all DHEA doses, scores were significantly different from the placebo (** $P = 0.006$ at 0.1%; *** $P < 0.001$ at 0.3%, 1% and 2%). Furthermore, the statistical analysis including all subjects showed that scoring at 2% DHEA was significantly different from 0.1%, 0.3% and 1%, with a higher mean value. Each box represents values between the 25th and 75th percentiles. The horizontal line is the median. The upper bars extend to the largest value, not exceeding the 75th percentile plus $1.5 \times$ the height of the box, while the lower bars extend to the smallest value not below the 25th percentile minus $1.5 \times$ the height of the box. The circle is an outlier.

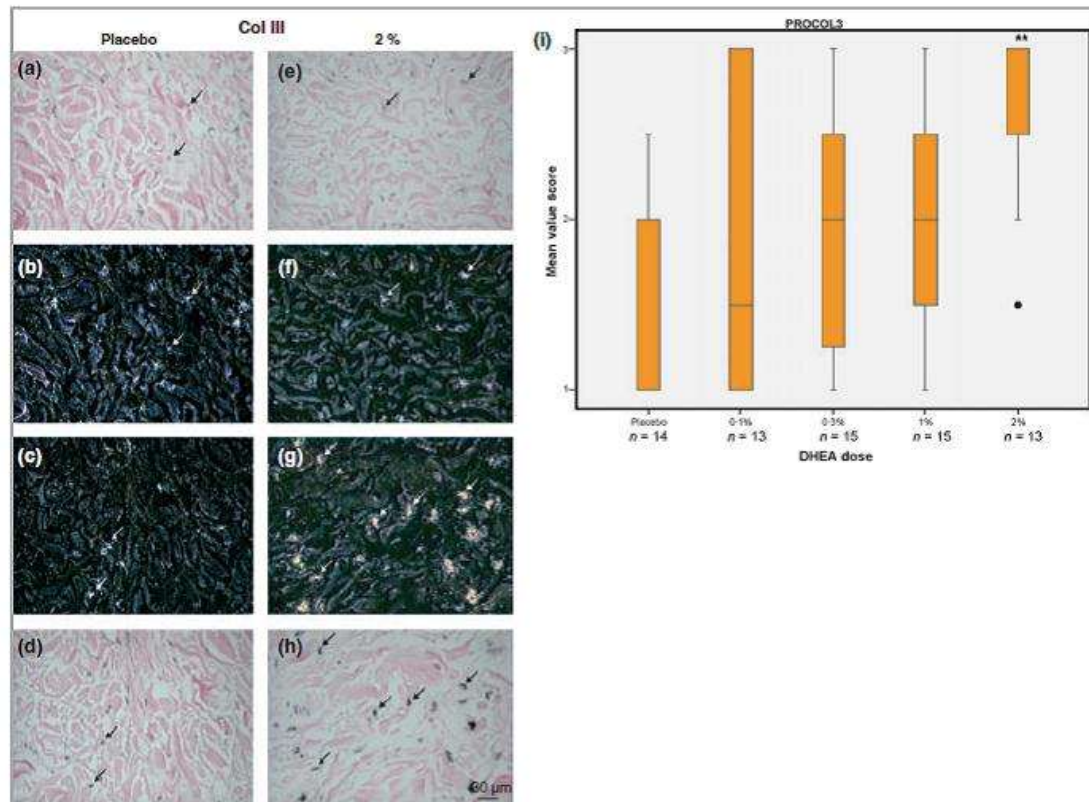


Fig 3. (a–h) Autoradiographs of the dermis of postmenopausal women hybridized with the antisense of collagen type III cRNA probe. The bright-field photographs show the blue-stained nuclei of the fibroblasts while the dark field of the same photograph indicates the silver grains decorating the fibroblasts (arrows). (a, b) The skin biopsy was collected before the application of the placebo cream; (c, d) the biopsy was collected 13 weeks after placebo cream application. As seen from the photographs (b) and (c), the number of labelled fibroblasts did not increase after application of the placebo cream. (e, f) The skin biopsy was collected before application of dehydroepiandrosterone (DHEA) cream; (g, h) the biopsy was collected 13 weeks after the application of 2% DHEA cream. By comparison of the photographs (f) and (g) and (e) and (h), the number of labelled fibroblasts significantly increased after application of the 2% DHEA cream. (i) Effect of topical application of DHEA on the expression of type 3 procollagen in the dermis of postmenopausal women. There was a significant increase in labelled fibroblast mRNA in the 2% DHEA group compared with the placebo group ($**P < 0.001$), whereas a trend was found in the 0.3% and the 1% DHEA groups ($P = 0.06$ and $P = 0.05$, respectively). Scores are expressed as mean values of the two experts' scores ($n = 70$). Each box represents values between the 25th and 75th percentiles. The horizontal line is the median. The upper bars extend to the largest value not exceeding the 75th percentile plus $1.5 \times$ the height of the box, while the lower bars extend to the smallest value not below the 25th percentile minus $1.5 \times$ the height of the box. The circle is an outlier.

antisense probe showed that several fibroblasts were labelled. For each subject of the placebo group, the silver grain labelling intensity and the number of labelled fibroblasts were similar before and after treatment. In the three groups that received the 0.1%, 0.3% or 1% DHEA dose, an increase in the silver grain labelling intensity and the number of labelled fibroblasts was observed after treatment in the majority of the subjects of these groups. For these three groups, higher scores were recorded although the difference with the placebo group was significant only for the 2% DHEA group (Fig. 3).

Heat shock protein 47 immunocytochemistry

HSP47 has been reported as a type I collagen chaperone protein.³⁰ As expected, it was found expressed in the cytoplasm of basal keratinocytes and dermal cells as well as in

blood vessel cells (Fig. 4). The labelling intensity of all dermal fibroblasts and their processes was higher than in most other cells. For each subject in the placebo group, when the staining intensity and the size and number of stained fibroblasts were compared before and after treatment, no significant differences were observed. In the two groups of women who received the two lowest doses of DHEA (0.1% and 0.3%), the increase in the labelling intensity and the number of labelled fibroblasts did not reach the level of statistical significance ($P = 0.06$ and $P = 0.09$ for the 0.1% and 0.3% doses, respectively) when compared with the placebo group. However, for the other two groups who received higher doses of DHEA (1% and 2%), the scoring results were statistically highly significant ($P < 0.01$) when compared with the placebo group (Fig. 4), with a strong increase in HSP47 labelling.

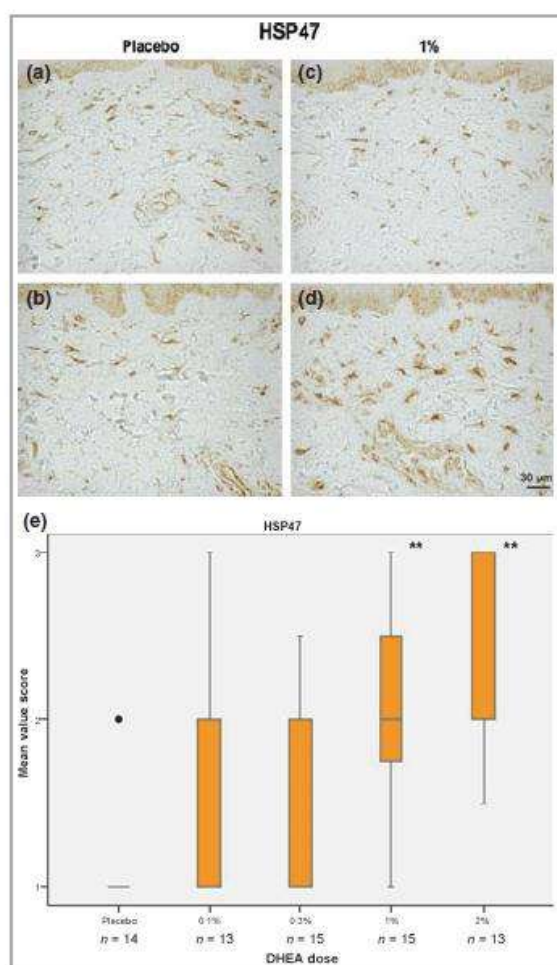


Fig 4. (a–d) Paraffin sections of the skin of postmenopausal women immunostained with antiheat shock protein (HSP) 47 antibody. In these representative sections, a strong immunoreactivity could be detected in the fibroblasts and their processes, while basal keratinocytes and blood vessels were less reactive. (a) The skin biopsy was collected before the application of the placebo cream; (b) the biopsy was collected 13 weeks after placebo cream application. The staining intensity and the number of stained fibroblasts are similar in (a) and (b). (c) The skin biopsy was collected before the application of dehydroepiandrosterone (DHEA) cream; (d) the biopsy was collected 13 weeks after the application of 1% DHEA cream. The staining intensity and the number of stained fibroblasts in (d) are clearly higher than in (c). (e) Effect of topical application of DHEA on the expression of HSP47 in the dermis of postmenopausal women. The number of dermal fibroblasts expressing HSP47 protein increased in each group compared with placebo with a statistical difference only reached in the 1% and 2% DHEA groups (** $P < 0.001$). Scores are expressed as the mean between the two experts' scores ($n = 70$). Each box represents values between the 25th and 75th percentiles. The horizontal line is the median. The upper bars extend to the largest value not exceeding the 75th percentile plus $1.5 \times$ the height of the box, while the lower bars extend to the smallest value not below the 25th percentile minus $1.5 \times$ the height of the box. The circle is an outlier.

Discussion

In this prospective placebo-controlled, randomized study, the data show the effects of DHEA treatment on the levels of AR, procollagen 1 and 3, and HSP47 in the skin of postmenopausal women. A marked stimulation by DHEA of AR levels was observed in the epidermis, in the absence of specific modification of overall epidermal architecture. In the dermis, a marked increase in the expression of types 1 and 3 procollagen was observed together with an increased expression of HSP47, a procollagen chaperone protein.³³ An increase of 574% over basal levels of the serum DHEA concentration was observed after twice-daily application of a 2% DHEA cream, while a much lower transformation into both androgens and oestrogens was measured, thus indicating the limited transformation of DHEA into active sex steroids in postmenopausal women.²⁸

In light of this effect of DHEA on the serum levels in postmenopausal women, we investigated for the first time the consequences of DHEA treatment on overall skin structure, morphology and gene expression, including both the epidermis and dermis compartments. In a previous study, it was observed that after 4 weeks of topical application of DHEA, procollagen $\alpha 1$ significantly increased in both aged and young human skin.²⁹ In mice, after 3 weeks of daily administration of a DHEA physiological dose, an increase of AR expression was observed in epidermal cells and in sebocytes.²² AR expression was also reported in human eccrine sweat glands and in scalp skin.^{32,34–36} In the present study, AR expression was detected in most of the nuclei of the epidermal cells and a significant increase was detected in response to DHEA treatment compared with placebo. These findings, in addition to those describing the presence in the skin of the main steroidogenic enzymes^{26,37,38} are in agreement with the belief that the human skin synthesizes a significant amount of sex steroids from DHEA, including the potent androgen DHT.²⁶

Using immunostaining, we also investigated the expression of ER α in epidermal cells where a low expression was observed in most of the nuclei (data not shown). ER β expression was also investigated and in agreement with previous observations,³² a much stronger expression than the ER α immunostaining was observed in most of the nuclei. However, the expression of ER α and ER β did not change when comparing the DHEA-treated groups with the placebo group.

In the present study, using CDC47 and Ki-67 cell proliferation markers, we also investigated and scored epidermal cell proliferation and epidermal thickness in the five examined groups but no significant differences were observed (results not shown). Thus, under our experimental conditions, DHEA treatment induced an increase in AR expression but that increase was not associated with a measurable increase in cell proliferation or in epidermal thickness.

The loss of skin firmness and elasticity, together with increased wrinkles, has been widely described as the clinical reflection of deep modifications in the collagenous and elastic fibres accompanying ageing. Alterations in collagen, the main

structural component of the skin dermis, were observed in both chronologically and photoaged skin.^{39,40} Indeed, an average of 2.1% decrease in collagen dermal content was reported per postmenopausal year for up to 15 years.⁴¹ Most studies have suggested that collagen loss was more closely related to menopause than to chronological age and was most likely related to hormonal effects.^{42,43}

Among the various types of collagens, type I is known to be the major collagen of human dermis as it represents > 90% and because of its recognized crucial role in the structural integrity of the dermis.⁴⁴ Besides type I collagen, type III collagen is found in most connective tissues and is usually coexpressed with type I collagen. Under physiological conditions, the amount of type III collagen regulates the diameter of type I fibrils.^{45,46} In a previous study, a statistically significant decrease in total collagen synthesis was observed with increasing donor age.⁴⁷ In addition, it has been reported that the total collagen content and the ratio of type III to type I collagen declines with age, this process being at least partially linked to an increase in matrix metalloproteinase (MMP) expression.

The degradation of collagen has also been linked to the activity of MMP collagenase. Lee et al.⁴⁸ reported that very high concentrations of DHEA in cultured human fibroblasts led to an increase of the human procollagen $\alpha 1$ and a decrease of the collagenase regulation gene at the transcriptional level. An effect of DHEA in the regulation of the production and degradation of the extracellular matrix has also been reported.²⁹ The authors indicated that DHEA administration could increase procollagen synthesis and inhibit collagen degradation by decreasing MMP-1 synthesis and increasing tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 production in cultured dermal fibroblasts. These authors have also reported that the topical application of 5% DHEA on young and aged human skin significantly increased the expression of procollagen $\alpha 1$ mRNA and protein. On the other hand, a decrease of MMP-1 and protein together with an increase of TIMP-1 protein were described.²⁹ Nevertheless, other studies present different conclusions as it was reported that DHEA increased type II collagen and TIMP-1 gene expression, but decreased type I collagen, MMP-1 and MMP-3 expression.⁴⁹

The present study describes an increase in the expression of both procollagen 1 and 3 mRNA following local application of DHEA. In addition, we have shown that HSP47 protein levels significantly increased with DHEA treatment. As HSP47 has been described as a type I collagen chaperone protein,³³ this upregulation underlines early modification in the regulation of extracellular matrix production. In addition, the HSP47 immunostaining showed an important increase in dermal fibroblast size in response to DHEA treatment.

In conclusion, it is well known that the skin undergoes regressive changes after menopause and that these changes are mainly related to a loss of skin collagen content. The potent stimulatory effect of topical DHEA reflected by an increase in the number and size of dermal fibroblasts and the expression of procollagen types 1 and 3 suggest the possibility that topical DHEA could be a useful antiageing agent in the skin.

What's already known about this topic?

- In preclinical models, dehydroepiandrosterone (DHEA) has been shown to induce dermal thickening, increase number and size of sebaceous glands and accelerate wound healing in ovariectomized mice.
- In postmenopausal women, skin DHEA has been shown to be involved in the regulation of collagen and extracellular matrix metalloproteinase synthesis.
- Using microarrays, topical DHEA has been shown to modulate the expression of several dermal genes, especially those involved in collagen formation.

What does this study add?

- The present study shows that after daily topical application of DHEA on the skin of postmenopausal women for 13 weeks, the expression of androgen receptor was markedly increased in the dermis, as evaluated by immunocytochemistry, while the expression levels of procollagen 1 and 3 mRNA measured by in situ hybridization were also increased in the same skin compartment.
- The expression of heat shock protein 47, a molecule believed to have a chaperone-like function in collagen biosynthesis, was also found by immunocytochemistry to be increased by DHEA in the dermis.

Acknowledgment

Funding was provided by Endorecherche Inc.

References

- 1 Zouboulis CC, Boschnakow A. Chronological ageing and photo-ageing of the human sebaceous gland. *Clin Exp Dermatol* 2001; **26**: 600–7.
- 2 Labrie F, Bélanger A, Bélanger P et al. Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; **99**: 182–8.
- 3 Labrie F. DHEA after menopause – sole source of sex steroids and potential sex steroid deficiency treatment. *Menopause Manag* 2010; **19**: 14–24.
- 4 Jemec GB, Scrup J. Short-term effects of topical 17 beta-oestradiol on human post-menopausal skin. *Maturitas* 1989; **11**: 229–34.
- 5 Punnonen R, Vaajalahti P, Teisala K. Local oestriol treatment improves the structure of elastic fibers in the skin of postmenopausal women. *Ann Chir Gynecol Suppl* 1987; **202**: 39–41.
- 6 Bélanger A, Candas B, Dupont A et al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**: 1086–90.
- 7 Labrie F, Bélanger A, Cusan L et al. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 2396–402.

- 8 Labrie F, Luu-The V, Bélanger A et al. Is DHEA a hormone? Starling review. *J Endocrinol* 2005; **187**:169–96.
- 9 Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelman JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; **59**:551–5.
- 10 Tchernof A, Després JP, Dupont A et al. Relation of steroid hormones to glucose tolerance and plasma insulin levels in men. *Diabetes Care* 1995; **18**:292–9.
- 11 MacEwen EG, Kurzman ID. Obesity in the dog: role of the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Nutr* 1991; **121**:S51–5.
- 12 Coleman DL, Schwizer RW, Leiter EH. Effect of genetic background on the therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetes-obesity mutants and in aged normal mice. *Diabetes* 1984; **33**:26–32.
- 13 Nestler JE, Clore JN, Blackard WG. Dehydroepiandrosterone: the 'missing link' between hyperinsulinemia and atherosclerosis? *FASEB J* 1992; **6**:3073–5.
- 14 Labrie F, Archer D, Bouchard C et al. Intravaginal dehydroepiandrosterone (Prasterone), a physiological and highly efficient treatment of vaginal atrophy. *Menopause* 2009; **16**:907–22.
- 15 Labrie F, Archer D, Bouchard C et al. Effect on intravaginal dehydroepiandrosterone (Prasterone) on libido and sexual dysfunction in postmenopausal women. *Menopause* 2009; **16**:923–31.
- 16 Labrie F, Archer D, Bouchard C et al. Serum steroid levels during 12-week intravaginal dehydroepiandrosterone administration. *Menopause* 2009; **16**:897–906.
- 17 Baulieu EE, Thomas G, Legrain S et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:4279–84.
- 18 Diamond P, Cusan L, Gomez JL et al. Metabolic effects of 12-month percutaneous DHEA replacement therapy in postmenopausal women. *J Endocrinol* 1996; **150**:S43–50.
- 19 Labrie F, Diamond P, Cusan L et al. Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**:3498–505.
- 20 Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, Yen SS. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **78**:1360–7.
- 21 Labrie F. Drug insight: breast cancer prevention and tissue-targeted hormone replacement therapy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; **3**:584–93.
- 22 Azzi L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol* 2005; **124**:22–7.
- 23 Sourla A, Richard V, Labrie F, Labrie C. Exclusive androgenic effect of dehydroepiandrosterone in sebaceous glands of rat skin. *J Endocrinol* 2000; **166**:455–62.
- 24 Mills SJ, Ashworth JJ, Gilliver SC et al. The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors. *J Invest Dermatol* 2005; **125**:1053–62.
- 25 Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **78**:C113–18.
- 26 Labrie F, Luu-The V, Labrie C et al. Intracrinology and the skin. *Horm Res* 2000; **54**:218–29.
- 27 Gingras S, Turgeon C, Brochu N et al. Characterization and modulation of sex steroid metabolizing activity in normal human keratinocytes in primary culture and HaCaT cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; **87**:167–79.
- 28 Labrie F, Bélanger A, Bélanger P et al. Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; **103**:178–88.
- 29 Shin MH, Rhie GE, Park CH et al. Modulation of collagen metabolism by the topical application of dehydroepiandrosterone to human skin. *J Invest Dermatol* 2005; **124**:315–23.
- 30 Calvo E, Luu-The V, Morissette J et al. Pangenomic changes induced by DHEA in the skin of postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; **112**:186–93.
- 31 Tacha DE, Chen T. Modified antigen retrieval procedure: calibration technique for microwave ovens. *J Histochemol* 1997; **17**:365–6.
- 32 Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K et al. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. *Exp Dermatol* 2003; **12**:181–90.
- 33 Dafforn TR, Della M, Miller AD. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *J Biol Chem* 2001; **276**:49310–19.
- 34 Choudhry R, Hodgins MB, Van der Kwast TK et al. Localization of androgen receptors in human skin by immunohistochemistry: implications for the hormonal regulation of hair growth, sebaceous glands and sweat glands. *J Endocrinol* 1992; **133**:467–75.
- 35 Hibberts NA, Howell AE, Randall VA. Balding hair follicle dermal papilla cells contain higher levels of androgen receptors than those from non-balding scalp. *J Endocrinol* 1998; **156**:59–65.
- 36 Mowszowicz I, Riahi M, Wright F. Androgen receptors in human skin cytosol. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; **52**:338–44.
- 37 Dumont M, Luu-The V, Dupont E et al. Characterization, expression and immunohistochemical localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase in human skin. *J Invest Dermatol* 1992; **99**:415–21.
- 38 Hay JB, Hodgins MB. Distribution of androgen metabolizing enzymes in isolated tissues of human forehead and axillary skin. *J Endocrinol* 1978; **79**:29–39.
- 39 Fisher GJ, Kang S, Varani J et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002; **138**:1462–70.
- 40 Moragas A, Garcia-Bonafe M, Sans M et al. Image analysis of dermal collagen changes during skin aging. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; **20**:493–9.
- 41 Brincat M, Versi E, Moniz CF et al. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. *Obstet Gynecol* 1987; **70**:123–7.
- 42 Affinito P, Palomba S, Sorrentino C et al. Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. *Maturitas* 1999; **33**:239–47.
- 43 Brincat M, Moniz CJ, Studd JW et al. Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; **92**:256–9.
- 44 Shuster S, Black MM, McVitie E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br J Dermatol* 1975; **93**:639–43.
- 45 Liu X, Wu H, Byrne M et al. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:1852–6.
- 46 Stevenson K, Kucich U, Whitbeck C et al. Functional changes in bladder tissue from type III collagen-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 2006; **283**:107–14.
- 47 Johnson BD, Page RC, Narayanan AS, Pieters HP. Effects of donor age on protein and collagen synthesis in vitro by human diploid fibroblasts. *Lab Invest* 1986; **55**:490–6.
- 48 Lee KS, Oh KY, Kim BC. Effects of dehydroepiandrosterone on collagen and collagenase gene expression by skin fibroblasts in culture. *J Dermatol Sci* 2000; **23**:103–10.
- 49 Jo H, Park JS, Kim EM et al. The in vitro effects of dehydroepiandrosterone on human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; **11**:585–94.

Claire DELOCHE¹
 Anne Marie MINONDO²
 Bruno A. BERNARD²
 Françoise BERNERD²
 Fabien SALAS³
 Julien GARNIER⁴
 Emmanuelle TANCREDÉ²

¹ L'Oréal Recherche,
 188, rue Paul Hochart,
 BP 553, 94152 Chevilly-Larue,
 France

² L'Oréal Recherche, Clichy, France

³ L'Oréal Recherche, Aulnay-sous-Bois,
 France

⁴ BIOalternatives, Gencay, France

Reprints: C. Deloche
 <cdeloche@rd.loreal.com>

Effect of C-xyloside on morphogenesis of the dermal epidermal junction in aged female skin. An unltrastructural pilot study

A placebo-controlled randomized pilot study was performed on five postmenopausal women aged from 60 to 75 years. The women applied 320 mg (2 mg/cm²) of either placebo or 10% C- β -D-xylopyranoside-2-hydroxy-propane (C-xyloside) cream to each outer forearm twice daily for 3 months. At the end of the treatment, skin biopsies were collected from application areas on both forearms. Transmission electron microscope examinations revealed skin ultrastructural changes at the dermal epidermal junction (DEJ) after 10% C-xyloside application for 3 months. The morphological appearance of the DEJ showed strong improvements, with more homogeneous and regular lamina densa in the C-xyloside-treated compared to the placebo treated skin areas. The number of zones showing basement membrane re-duplication was indeed strikingly reduced on C-xyloside-treated skin. These ultrastructural results were further confirmed by a statistically significant increase in the expression levels of α 6-integrin and laminin-332, as estimated by immunohistochemistry. Altogether, these data suggest that topical C-xyloside application *in vivo* may be efficient in inducing a better dermal-epidermal cohesion when such a junction is deficient, as is the case in photo-aged or chronologically aged skin. Moreover, a statistically significant increase in CD44 expression was noted in the epidermis of C-xyloside-treated compared to the placebo treated skin areas.

Key words: skin ageing, dermal epidermal junction, C-xyloside, Laminin 332, α 6-integrin subunit

Article accepted on 11/19/2010

Skin ageing is a physiological process which is a consequence of both intrinsic factors linked to chronological ageing, and extrinsic or environmental factors. The resulting effects, such as skin laxity and wrinkle formation, are clinically obvious. Some of the morphological and biological changes which underline clinical damage are well characterized. For example, at the tissue level, these alterations have been demonstrated by standard histology and immunohistochemistry: epidermal atrophy, flattening of the dermal-epidermal junction (DEJ) and elastic fiber elastosis [1-3]. At the cellular or molecular level, electron microscopy [4] or analytical techniques such as transcriptomic studies [5] provide fine details of age-related alterations affecting all skin compartments.

In the epidermis, proliferation rates and keratinocyte differentiation are altered. The expression of molecules specifically involved in the adhesion of basal keratinocytes (integrins) or keratinocyte cohesion (CD44) decreases [6-8]. In the dermis, the architecture of the extracellular matrix is also progressively altered during aging. The mechanical properties and the solubility of collagen fibers decrease, the elastic fiber network deteriorates, glycosaminoglycan (GAGs) and proteoglycan (PGs) synthesis is strongly altered, both quantitatively and qualitatively [9,10]. Besides age-related epidermal and dermal modifications, alterations of the DEJ molecular structures have also been

described [4]. Notably, a major change described in skin ageing is the re-duplication of the lamina densa, corresponding to the presence of several superposed layers of lamina densa, and the associated anchoring fibril complex [4]. Moreover a decrease in collagen VII expression, which is responsible for anchoring the basement membrane to dermal collagen fibers, has been reported [11]. These modifications might have strong repercussions on the overall skin biology and properties, considering that the lamina densa and its associated anchoring fibril complex have an essential role at the epidermis-dermis interface. DEJ is indeed a complex structure resulting from interactions between epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts [12, 13], ensuring the cohesion between the dermis and epidermis but also providing a dynamic interface for the regulation of soluble factor exchanges between the two compartments [14, 15]. During the ageing process, alterations found in both the epidermis and dermis as well as at the DEJ level would thus entail progressive functional changes in skin resistance to mechanical stress [16, 17] and tissue homeostasis [17], and ultimately deterioration of the whole skin appearance and wrinkle development.

Of note, GAGs and proteoglycans are major components of extracellular matrix and DEJ, and heparin sulfate and chondroitin sulfate are linked by xylose to serine residues of core proteins. More than 35 years ago, Okayama and

colleagues found that D-xylose in β -linkage to a hydrophobic aglycone could mimic glycosyltransferase natural substrate [18] and xylose derivatives such as β -xylosides have been shown to increase GAGs synthesis [19]. None of these structures, however, were based on a C-xyloside bond between sugar and alkyl chains. Recently, C-glycosides received increasing interest as carbohydrate biomimetics and the substitution of an O-glycosidic position of native carbohydrate structures by a C-glycosidic carbone-carbone linkage rendered such analogues stable against acidic or enzymatic hydrolysis [20]. The C- β -D-xylopyranoside-2-hydroxy-propane (here referred to as C-xyloside) was therefore aimed to do so [21]. This stable structure indeed revealed a specific profile of activity with increased GAGs but, more interestingly, heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) in skin cell cultures as well as in an organotypic model of atrophic human skin [22]. It also increases CD44 hyaluronic acid receptor expression [23], and thus may also have a role in the regulation of epidermal homeostasis. Interestingly, in a reconstructed skin model, it has been shown to increase deposition of basement membrane components such as collagen IV, collagen VII and laminin $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (laminin 332) as well as sub-epidermal components such as pro-collagen I and fibrillin 1 [23]. This effect was supposed to be triggered by interactions between GAGs/PGs and fibrillar matrix proteins. Perlecan and syndecan, both induced by C-xyloside [22], were actually found to bind to basement membrane components [24-26]. Previous unpublished transmission electron microscopy studies from our laboratory on human *in vitro* reconstructed skin (Realskin[®]) revealed that C-xyloside induced the production of a significant number of anchoring filaments in the subepidermal basement membrane zone, an increase in microfibrillar bundles in the upper dermis and a glycosaminoglycan accumulation along the collagen fibrils. The purpose of the present pilot clinical study was to confirm whether ultrastructural improvement of the dermal epidermal junction was also detectable *in vivo* following C-xyloside application on the skin in a homogeneous group of aged volunteers (post menopausal women).

Subjects and methods

A double-blind randomized trial was performed to evaluate the clinical effects and the ultrastructural changes in aged skin with a 3-month daily application of a cream containing 10% C-xyloside. This concentration was chosen, taking into account the 0.016% *in vitro* effective concentration [23] and a 3 to 7% bio-availability when topically applied. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Saint-Louis in Paris, France.

Subjects

In this pilot double blind study, five healthy postmenopausal women (phototypes I to III), aged 60 to 65 years, were recruited. This panel was chosen because skin modifications linked to the menopause closely reflect those observed during chronological aging [27]. Moreover, this panel was selected with a homogeneous densiscore grade of 4 (on a 0-5 scale) [17], reflecting a similar advanced skin aging

level. All subjects signed informed consent. Subjects with a known allergy to any of the ingredients of the cosmetic cream or to the local anaesthesia (xylocaïne) required to collect punch biopsies were not included. No topical application of any other product onto the tested skin areas (forearms) was permitted. The other inclusion criteria were: a negative serology for HIV1/HIV2, hepatitis B (antigen Hbs) and hepatitis C within the week prior to starting the study; no hormone replacement therapy for one year before the study.

Women were randomized on location to receive topical application of a 10% (weight/volume) C-xyloside cream to one forearm (more precisely to the outer elbow bend) and placebo (vehicle) cream to the other forearm (same area). The first application of the creams was supervised by the investigator at the inclusion visit (Day 1). Subjects were then instructed to apply about 320 mg (2 mg/cm²) of each cream to the allocated forearm twice daily, in the morning and evening, for 3 months. Visits took place on D1 (Day 1) at baseline, on D15, D29, D43, D57 and D71 for control visits, on D85 for biopsy collection and on D92 and D99 for wound healing control.

Clinical assessments

Skin biopsies

Two punch biopsies (3 mm in diameter) were collected from both forearms of the 5 volunteers, under local anesthesia, after 3 months of treatment. One biopsy was processed for transmission electron microscopy (TEM), the other one for immuno-histochemistry.

Electron microscopy

Skin biopsy samples were processed in order to enhance the electron density of extracellular matrix components. Freshly obtained biopsies were fixed directly in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) containing either 0.7% RHT (Ruthenium Hexamine Trichloride, Polysciences Inc.) or 1% tannic acid (Polysciences Inc.) for 4 h at room temperature. The samples were minced into 1 mm³ pieces before post-fixation in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer either containing 0.7% RHT or not, for 1 h at room temperature. After dehydration in graded ethanol solutions, all the samples were embedded in Epon-epoxy mixture (EMBed-812 embedding kit, Electron Microscopy Sciences). Toluidine blue stained semi-thin sections were observed under a Leica DMLB light microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Ultrathin sections, cut with a diamond knife on a RMC MT-7 ultramicrotome, were weakly counterstained with a 4% alcoholic solution of uranyl acetate and Reynolds' lead citrate and were examined on a Zeiss CEM 902 A transmission electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Immunohistochemistry

Immediately after collection, the 3 mm diameter biopsies were embedded in Tissue-Tek OCT compound (Miles, Naperville, IL, USA) quickly frozen over dry ice and stored at -80 °C until use. After thawing, cryosections were fixed in acetone/methanol mixture and air-dried. After

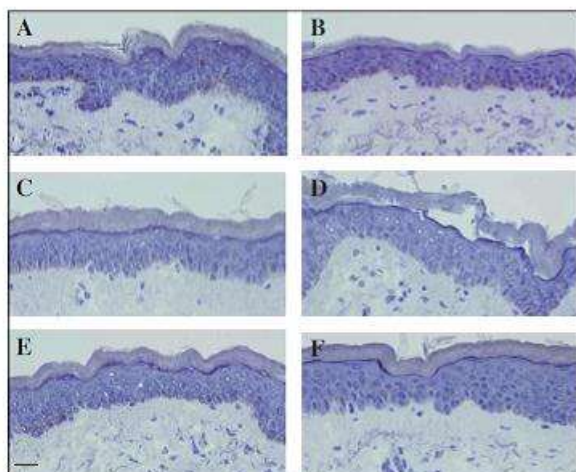


Figure 1. Histology. Paired placebo (A, C, E) and C-xyloside treated (B, D, F) skin samples were stained with HE. Bar=25 µm.

saturation with PBS-Tween20 containing 5% non-fat dried milk, slides were incubated for 1 hour with the primary antibody diluted in PBS- Tween20 as follows: 1:50 for anti-laminin-332 (MAB1947, Chemicon, Hants, UK), 1:50 for the anti-integrin $\alpha 6$ subunit (SC13542, SantaCruz Inc., Santa Cruz, CA, USA), 1:50 for anti-collagen IV (M0785, Dako, Trappes, France), 1:200 for anti-nidogen (481978, Calbiochem, France Biochem, Meudon, France), 1:100 for anti-perlecan (13-4400, Zymed, Montrouge, France), and 1:200 for anti-CD44 (SC-7297, Santa Cruz). Immunolabeling was performed using an automater immunostainer (Autostainerplus Dako, Trappes). After washing, an Alexa Fluor 488-conjugate Goat anti-mouse was used as secondary antibody. Nuclear counterstaining using propidium iodide (P4170, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was carried out. Slides were washed in PBS-Tween20 buffer and were mounted with "Fluorescent Mounting Medium" middle (S3023, Dako). In each condition, slides were examined with a NIKON DXM 1200F microscope, piloted by Lucia 4.8 software. The quantification of fluorescence intensity was made with Lucia 4.8 software. Descriptive analyses (mean intensity of fluorescence) were generated for each treatment. For overall skin architecture observation, sections were also stained with haematoxylin and eosin (HE).

Results

Topical treatment with C-xyloside does not modify the overall epidermal morphology

Morphological analysis of C-xyloside treated skin revealed a normal appearance without any alterations in the epidermal differentiation and overall skin architecture was similar to that of placebo control (figures 1A-F). A slight difference could nevertheless be detected at the DEJ, which looked fuzzy in control samples and sharper in C-xyloside treated samples.

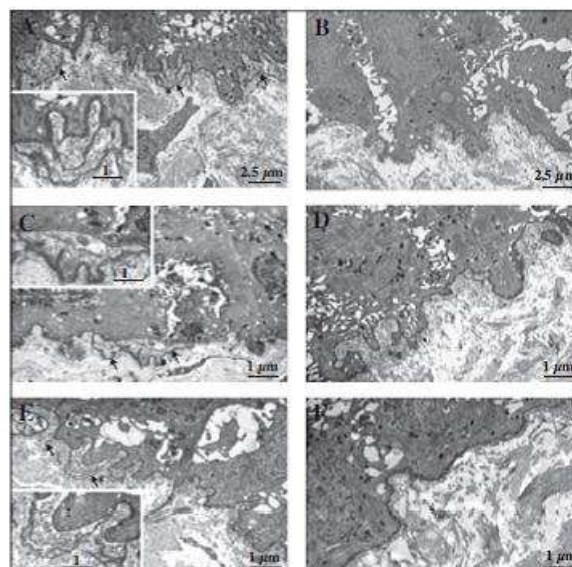


Figure 2. Transmission electron microscopy of aged skin. A, C, E) Numerous areas with reduplicated lamina densa (LD) (arrows) were seen at the DEJ in the placebo-treated aged skin after 3 months. B, D, F) Note the improvement in the structural appearance of LD in C-xyloside-treated aged skin after 3 months: neither re-duplication of the LD nor disruption can be noticed.

Topical treatment with C-xyloside induces normalization of the DEJ

In aged skin samples treated with placebo cream, the major feature observed in the DEJ ultrastructure was a re-duplication of the lamina densa (figures 2A, C, E) in several areas along the basement membrane (BM). In all analyzed samples from skin areas treated with the 10% C-xyloside cream, the DEJ appeared more homogeneous. In every sample, the lamina densa showed a striking decrease in re-duplication (figures 2B, D, F).

Topical treatment with C-xyloside stimulates the expression of DEJ components

Since C-xyloside treatment induced a normalization of the DEJ at the ultrastructural level, we then questioned whether the expressions of laminin-332, the $\alpha 6$ -integrin subunit, collagen IV and perlecan DEJ components were also stimulated after *in vivo* C-xyloside treatment. Indeed, laminin-332, the $\alpha 6$ -integrin subunit and collagen IV were previously reported as induced by C-xyloside in *in vitro* reconstructed skin [23] while perlecan expression was found to be induced by C-xyloside in corticosteroid atrophic human skin [22].

Laminin-332

As expected, Laminin-332 was expressed at the DEJ in control biopsies (figure 3A). Nevertheless, after 3 months' treatment, the intensity of laminin-332 labeling appeared stronger at the DEJ of C-xyloside treated skin samples

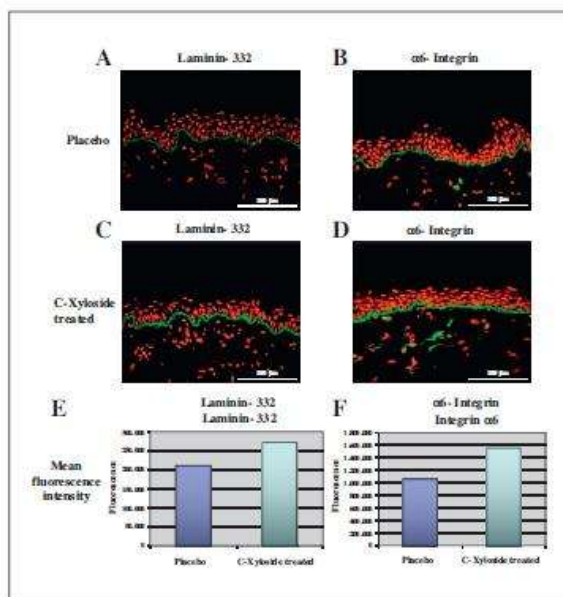


Figure 3. Effect of C-xyloside on the deposition of basal membrane-specific proteins (laminin 332 and the $\alpha 6$ -integrin subunit) in aged human skin. Immunofluorescence labellings were performed on biopsies collected after 3 month treatment. Note a higher fluorescence intensity in C-xyloside treated (C, D) compared to placebo treated group (A, B). (A, C): laminin-332, (B, D): the $\alpha 6$ -integrin subunit. Quantitative analyses of fluorescence intensity of laminin 332 and the $\alpha 6$ -integrin subunit at the dermal epidermal junction level showed an increase by 30% and 50%, in C-xyloside treated group versus control, for laminin 332 (E) and $\alpha 6$ -integrin the (F), respectively. AU = Arbitrary Unit.

(figure 3C). A quantitative analysis of mean fluorescence intensity revealed a 30% increase in C-xyloside treated compared to the placebo treated sample group (figure 3E).

$\alpha 6$ -integrin subunit

For the $\alpha 6$ -integrin subunit, labeling was also found at the DEJ level in control (placebo treated) skin biopsies (figure 3B). Compared to placebo samples, however, the intensity of $\alpha 6$ -integrin subunit labeling was markedly increased in samples from skin treated for 3 months with C-xyloside compared to samples from placebo treated skin (figure 3D). A quantitative analysis of mean fluorescence intensity revealed a 50% increase in the C-xyloside group compared to the placebo group (figure 3F).

Collagen IV and Perlecan

Although a 10% increase in intensity labeling was observed for both markers in the C-xyloside group, it did not reach statistical significance (results not shown).

Topical treatment with C-xyloside stimulates CD44 expression in the epidermis

Since CD44 expression decreased in aged skin [8] and was found induced by C-xyloside in corticosteroid atrophic

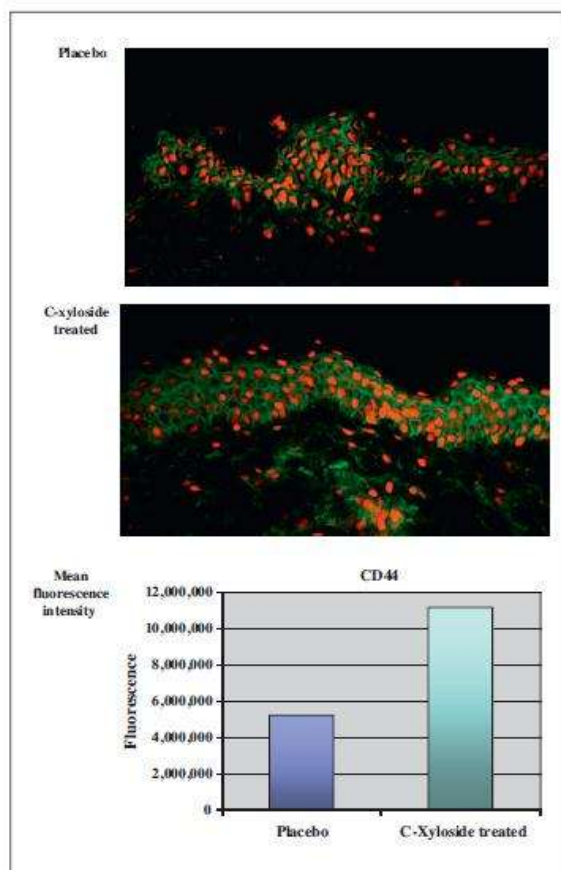


Figure 4. Effect of C-xyloside on CD44 expression in aged human skin. Immunofluorescence labellings were performed on biopsies collected after 3 months' treatment. Note: a higher fluorescence intensity in C-xyloside treated compared to placebo treated group. Quantitative analysis of CD44 fluorescence intensity showed an increase by 117%, in the C-xyloside treated group compared to the placebo group. AU = Arbitrary Unit.

human skin [22], we questioned whether *in vivo* C-xyloside treatment would stimulate its expression in aged skin. Compared to placebo samples (figure 4A), the intensity CD44 labeling was markedly increased in samples from skin treated for 3 months with C-xyloside compared to samples from placebo treated skin (figure 4B). A quantitative analysis of mean fluorescence intensity revealed a 117% increase in the C-xyloside group compared to the placebo group (figure 4C).

Discussion

It has been previously demonstrated that C-xyloside had biological effects on DEJ morphogenesis in a reconstructed skin model [23], and more specifically, in the corticosteroid atrophic skin model on the expression of basement membrane components [22]. Notably, in a reconstructed

skin model, it has been shown to increase the deposition of basement membrane components such as collagen IV, collagen VII and laminin 332, as well as dermal components such as pro-collagen I and fibrillin 1 [23]. In the atrophic skin model, C-xyloside has been shown to increase skin expression of glycoaminoglycans and proteoglycans, such as perlecan at the DEJ [22].

In the present study, we were looking for corresponding effects on aged human skin *in vivo*. This pilot study was carried out on 5 women, 60 to 65 year old, applying a 10% C-xyloside cream daily for three months. Classical histology revealed an increase in sharpness of basement membrane zone. At the ultrastructural level, significant morphological changes were noted at the DEJ. The DEJ appeared more consistent with a homogeneous and regular aspect on C-xyloside treated aged skin compared to placebo treated, in which a re-duplication was constantly observed. The DEJ structural appearance in C-xyloside treated skin thus was similar to that of young skin [4] and C-xyloside treatment clearly seemed to improve some of the structural signs of cutaneous ageing [4,28].

In addition to a better ultrastructural DEJ homogeneity, we observed that C-xyloside treatment induced an increase in laminin-332, an essential component of the basal membrane, together with an increase in the $\alpha 6$ -integrin subunit, a specific trans-membrane component of the laminin-332 receptor at hemidesmosomes. Although not statistically significant, a 10% increase in collagen IV and perlecan labeling was also noted. Takeda *et al.* [29] reported that a higher level of laminin-332 improved the grafting efficiency of keratinocytes on the epidermal basement membrane (BM) which is crucial for the attachment. Moreover some diseases involving mutations in genes encoding for laminin-332 were characterized by DEJ disruption, thus emphasizing the contribution of DEJ in resistance to mechanical stress [30]. In addition, among the various proteins of the epidermal basement membrane, it has been reported that laminin-332 is involved in correct DEJ component localization [31] and could accelerate basement membrane formation [32]. Altogether, these interconnecting proteins are responsible for the maintenance of the integrity of the dermal epidermal junction architecture. In the present study, histological, ultrastructural and immunofluorescence data demonstrate that, with a 3 month C-xyloside treatment, the DEJ quality of aged skin can be improved, with an increased deposition of key components such as laminin-332, the $\alpha 6$ -integrin subunit and to a lesser extent, collagen IV and perlecan. Considering the similarity of these results with those obtained in an *in vitro* model [23], one might predict that collagen VII, collagen I and fibrillin 1 deposition could also be improved, although it remains to be demonstrated.

Of note, the improvement noticed at the DEJ level with C-xyloside treatment was accompanied by an increased epidermal CD44 expression, previously found decreased in aged skin [8], as well as in corticosteroid atrophic skin [22]. Again, the similarity of the results obtained in an *ex vivo* model [22] and in *in vivo* aged skin is striking. One might thus predict that increased syndecan 1 and 4 [22] could also be observed. The increased CD44 expression might translate into a better keratinocyte-keratinocyte adhesion and hence, epidermal cohesion.

Conclusion

It is well known that with ageing, the skin undergoes regressive changes including DEJ flattening and lamina densa re-duplication, resulting in a weakened resistance to mechanical stress [16, 17]. The present study suggests that C-xyloside may have a potent beneficial effect on DEJ morphology and could contribute to improve basement membrane integrity, especially when it is damaged during the ageing process. We believe that caring for the DEJ structural integrity is pivotal to maintaining healthy skin and preventing the first stage of structural and functional changes of the epidermis in aged skin. Altogether, the overall modifications observed in response to C-xyloside treatment of aged skin might result in a better cohesion, both at the DEJ and epidermal levels, an improved epidermal homeostasis and, in the long term, an improvement of wrinkles. Clinical studies on a larger number of volunteers are needed to confirm these biological effects. ■

Disclosure. Acknowledgements: We would like to thank Dr François Xavier Bernard (BIOalternatives, Gencay, France) for technical support in the project, Dr. Nathalie Pineau, Mrs Catherine Bredoux, Dr Ana-Maria Pena and Dr Claude Bouillon for critical comments of the manuscript. Financial support: none. Conflict of interest: none.

References

1. Branchet MC, Boissac S, *et al.* Skin thickness changes in normal aging skin. *Gerontol* 1990; 36: 28-35.
2. Kurban R, Bhawan J. Histological changes in skin associated with aging. *J Dermatol Surg Oncol* 1990; 16: 908-14.
3. Gogly B, Godeau G, Septier D, Hornebeck W, Pellat B, Jeandel C. Measurement of the amounts of elastic fibers in the skin and temporal arteries of healthy aged individuals with automated image analysis. *Gerontol* 1998; 44: 318-23.
4. Lavker RM, Zheng PS, Dong G. Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J Invest Dermatol* 1987; 88(3 Suppl.): 44s-51s.
5. Lener T, Moll PR, Rinnerthaler M, Bauer J, Aberger F, Richter K. Expression profiling of aging in the human skin. *Exp Gerontol* 2006; 41: 387-97.
6. Yaar M, Eller MS, Gilchrist BA. Fifty years of skin aging. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2002; 7: 51-8.
7. Aumailley M, Rousselle P. Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biology* 1999; 18: 19-28.
8. Kaya G, Tran C, Sorg O, *et al.* Hyaluronate fragments reverse skin atrophy by a CD44-dependent mechanism. *PLoS Med* 2006; 3: e493.
9. Choi AMK, Olsen DR, *et al.* Differential extracellular matrix gene expression by fibroblasts during their proliferative life span in vitro and at senescence. *J Cell Physiol* 1992; 151: 147-55.
10. Ghersech I, Lotti T, *et al.* Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int J Dermatol* 1994; 33: 119-22.
11. Chen YQ, Mauviel A, Ryyanen J, Sollberg S, Uitto J. Type VII collagen gene expression by human skin fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of donor age and cytokine responses. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 205-9.
12. Marionnet C, Vioux-Chagnoleau C, Pierrard C, Sok J, Asselineau D, Bernard F. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 2006; 136: 971-9.

13. Marinkovich MP, Keene DR, Rimberg CS, Burgeson RE. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev Dyn* 1993;197:255-67.
14. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 1989;245:752-5.
15. Hirai Y, Takebe K, Takashina M, Kobayashi S, Takeichi M. Epimorphin: a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell* 1992;69:471-81.
16. Lavker RM. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 1979;73:59-66.
17. Batisse D, Bazin R, Baldeweck T, Querleux B, Lévêque JL. Influence of age on the wrinkling capacities of skin. *Skin Res Technol* 2002;8:148-54.
18. Robinson HC, Brett MJ, Tralaggaan PJ, Lowther DA, Okayama M. The effect of D-xylose, beta-D-xylosides and beta-D-galactosides on chondroitin sulphate biosynthesis in embryonic chicken cartilage. *Biochem J* 1975;148:25-34.
19. Fritz TA, Esko JD. Xyloside priming of glycosaminoglycan biosynthesis and inhibition of proteoglycan assembly. *Methods Mol Biol* 2001;171:317-23.
20. Compain P, Martin OR. Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2001;9:3077-92.
21. Cavezza A, Boule C, Gueguinat A, et al. Synthesis of Pro-Xylane™: a new biologically active C-glucoside in aqueous media. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:845-9.
22. Pineau N, Bernerd F, Cavezza A, Dalko-Csiba M, Breton L. A new C-xylopyranoside derivative induces skin expression of glycosaminoglycans and heparin sulphate proteoglycans. *Eur J Dermatol* 2008;18:36-41.
23. Sok J, Pineau N, Dalko-Csiba M, Breton L, Bernerd F. Improvement of the dermal epidermal junction in human reconstructed skin by a new C-xylopyranoside derivative. *Eur J Dermatol* 2008;18:297-302.
24. Bengtsson E, Mörgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegård D, Asberg A. The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. *J Biol Chem* 2002;277:15061-8.
25. Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:618-24.
26. Okamoto O, Bachy S, Odenthal U, et al. Rousselle P. Normal human keratinocytes bind to the alpha3LG4/5 domain of unprocessed laminin-5 through the receptor syndecan-1. *J Biol Chem* 2003;278:44168-77.
27. Vaillant L, et al. *Rep Hum Horm* 1996;9:221-5, [ou Vaillant L, Callens A. Hormone replacement treatment and skin aging. *Thérapie* 1996;51:67-70].
28. Lavker RM. Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. In: Gilchrist BA, editor. *Photodamage*. Cambridge USA: Blackwell Science Inc., 1995, p. 123-35.
29. Takeda A, Kadoya K, Shiota N, et al. Pretreatment of human keratinocyte sheets with laminin 5 improves their grafting efficiency. *J Invest Dermatol* 1999;113:38-42.
30. Burgeson RE, Christiano RE. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:651-8.
31. McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci* 2003;31:169-77.
32. Tsunenaga M, Adachi E, Amano S, Burgeson RE, Nishiyama T. Laminin 5 can promote assembly of the lamina densa in the skin equivalent model. *Matrix Biol* 1998;17:603-13.

ANNEXES

**PUBLICATIONS TRAVAUX SCIENTIQUES
AUTRES TRAVAUX**

Review

Changes in serum DHEA and eleven of its metabolites during 12-month percutaneous administration of DHEA

Fernand Labrie^{a,*}, Leonello Cusan^a, Jose-Luis Gomez^a, Céline Martel^a,
René Bérubé^a, Patrick Bélanger^a, Véronique Chaussade^b,
Claire Deloche^c, Jacques Leclaire^c

^a Laboratory of Molecular Endocrinology and Oncology, Laval University Hospital Research Center (CRCHUL) and Laval University, Quebec City, Quebec G1V 4G2, Canada

^b Service de Dermatologie du Pr Philippe Saiag, Hôpital Ambroise Paré, 9 avenue Charles de Gaulle, 92104 Boulogne, Cedex, France

^c L'Oréal Recherche, 90 rue du Général Roguet, Centre Charles Zviak, 92583 Clichy Cedex, France

Received 27 August 2007; received in revised form 24 January 2008; accepted 6 February 2008

Abstract

Healthy postmenopausal women aged 60–65 years ($n=150$) were randomized to receive twice daily application on the skin of 3 g of a 0.3% dehydroepiandrosterone (DHEA) or placebo emulsion for 12 months. Serum DHEA and eleven of its metabolites were measured at screening and on day 1, as well as at 1, 3, 6, 9 and 12 months to study long-term metabolism. While serum DHEA and androst-5-ene-3 β , 17 β -diol (5-diol) increased by 203% and 178%, respectively, on average, during the 12-month period, the sum of concentrations of the metabolites of androgens, namely androsterone glucuronide (ADT-G), androstane-3 α ,17 β -diol-3G and -17G increased by only 71% while usually non statistically significant changes of 30%, 17% and 20% were observed for estrone (E_1), estradiol (E_2) and E_1 sulfate (E_1 -S), respectively.

Despite the return of serum DHEA to normal premenopausal values with the present DHEA treatment regimen, the 65% decrease in the androgen pool found in this group of postmenopausal women is in fact corrected by only 24%, thus remaining 41% below the values found in normal premenopausal women. In fact, the changes in serum DHEA observed after percutaneous DHEA administration are a 186% overestimate of the true changes in androgen formation while the overestimate of estrogen production is even much higher. On the other hand, the pharmacokinetics of the steroids are stable over the 12-month period with no significant induction or decrease of activity of the enzymatic systems transforming DHEA predominantly into androgens.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: DHEA; Metabolites; Androgens; Estrogens; Menopause; Skin; Steroids

Contents

1. Introduction.....	2
2. Subjects, materials and methods	2
2.1. Subjects	2
2.2. Mass spectrometry steroid assays	3
2.3. Statistical analysis	3
3. Results	3
4. Discussion	7
References	8

* Corresponding author. Tel.: +1 418 654 2704; fax: +1 418 654 2735.
E-mail address: fernand.labrie@crchul.ulaval.ca (F. Labrie).

1. Introduction

While the ovaries and the testes are the exclusive sources of androgens and estrogens in lower mammals, the situation is very different in man and higher primates, where active sex steroids are for a large part (androgens in men) or wholly (after menopause for estrogens in women) synthesized locally in peripheral tissues, thus permitting target tissues to adjust the formation and metabolism of sex steroids according to local needs [1]. Such a local biosynthesis and action of androgens in target tissues eliminates the exposure of other tissues to androgens and thus minimizes the risks of undesirable masculinizing or other androgen-related side effects. The same applies to estrogens, although a reliable parameter of total estrogen secretion (comparable to the glucuronides identified for androgens) has yet to be determined.

The almost exclusive focus on the role of ovarian estrogens in women has removed the attention from the dramatic 70% fall in circulating DHEA which already occurs between the ages of 20–30 and 50–60 years [2–5]. Since DHEA is transformed into both androgens and estrogens in peripheral tissues, such a fall in serum DHEA and DHEA-S explains why women at menopause are not only lacking estrogens but are also deprived from androgens. This situation has been proposed to be associated with age-related diseases, including skin atrophy, insulin resistance [6,7], obesity [8–10], bone loss, vaginal atrophy, type 2 diabetes, loss of muscle mass and strength (see Labrie [11], for review). Moreover, much attention has been given to the benefits of DHEA administered to postmenopausal women, especially on the bone, skin, vagina, type 2 diabetes, loss of muscle mass, fat accumulation and well being after oral [12–14] as well as percutaneous [15,16] administration of the precursor steroid (see Labrie [11], for review).

While one would ideally like to know the level of androgenic activity in each specific tissue, such a direct measurement of the intratissular concentration of the active androgens is not possible in the human except under exceptional circumstances such as in samples of tissue obtained at surgery [17–19]. However, while not permitting the assessment of androgenic activity in specific tissues, measurement of the glucuronide derivatives of androsterone (ADT) and androstane-3 α ,17 β -diol (3 α -diol) by validated mass spectrometry techniques permits a precise measure of the total pool of androgens in the whole organism [20–23]. In fact, it is now well established that uridine glucuronosyl transferase 2 B7 (UGT 2 B7), UGT 2 B15 and UGT 2 B17 are the three enzymes responsible for the glucuronidation of all androgens and their metabolites in the human [24]. This recent completion of the identification and characterization of all the human UDP-glucuronosyl transferases now makes possible the use of the glucuronide derivatives of androgens as markers of the total pool of androgens in both women and men.

We have recently shown in a 2-week study [22] as well as in a 3-month study [21], that DHEA is transformed into active androgens and estrogens in peripheral intracrine tissues with no or minimal release of the active steroids estrone (E₁), estradiol (E₂) or testosterone in the circulation. The present 12-month study has permitted to study the changes in serum DHEA and eleven

of its metabolites over a long-term 12-month period of twice daily application on the skin of 3 g of a 0.3% DHEA emulsion in postmenopausal women. Such data provide important information on the stability of DHEA metabolism over a long period of percutaneous administration which avoids the metabolism associated with first pass through the liver and closely mimics endogenous DHEA secretion and metabolism.

2. Subjects, materials and methods

2.1. Subjects

One-hundred and fifty (150) healthy postmenopausal Caucasian women aged 60–65 years participated in this study after IRB approval and having given written informed consent. No subject had taken hormone replacement therapy during the previous 6 months. No subject was suffering from an endocrine disorder, and none was under treatment with lipid- or glucose-lowering agents. There was no active or history of thromboembolic disease, significant metabolic or endocrine disease and no clinically significant gastrointestinal, liver or gallbladder disease. There was no migraine and no diabetes mellitus not controlled by conventional therapy. There was no corticosteroid treatment within 6 weeks of study entry as well as treatment with β -carotenoid, retinoic acid, hydroquinone, α -hydroxyacid (including inhaled, topical or oral). There was no hypertension equal to or above 160/95 mmHg or not controlled by standard therapy as well as no confirmed clinically significant depression or confirmed severe psychiatric disturbance.

There was no administration of any investigational drug within 30 days of screening visit or previous treatment with androgens or anabolic steroids within 6 months prior to the screening visit. There was no exposure to or use of antidepressants, antipsychotics, or analgesics, within 30 days prior to enrollment. Smoking any number of cigarettes was an exclusion criteria. There was no former or present narcotic addiction or alcoholism. The body weight ranged between 18.5 and 29.9 of ideal body weight according to Body Mass Index (BMI). There was no hepatic or renal impairment or condition known to affect drug or steroid metabolism. All subjects had a medical history, complete physical examination, serum biochemistry as well as complete blood and urinalysis.

Each subject was randomly assigned to placebo or 0.3% DHEA. Daily, before breakfast, and after supper, for 12 months, subjects received 3.0 ml of one of the two emulsions. All subjects were instructed to apply the study treatment twice daily (in the morning between 0:600 and 10:30 h and in the evening between 18:00 and 22:30 h) during 12 months. The first application of the study treatment was carried out at the investigational site where instructions were provided to the subjects on how to apply the topical emulsion. Three hundred microliters (0.3 ml) of the emulsion were applied on the forehead and face (including 2 cm past the hair line, on the upper forehead and the upper lip), 0.3 ml on the upper chest, 0.3 ml each on the back of right and left forearms and back of hands, 0.3 ml each on the back of right and left arms, 0.3 ml each on the external face of the right and left legs, 0.3 ml each on the upper half of external face of both

Table 1

Changes in serum DHEA (A) and 5-diol (B) levels in 60–65 year-old postmenopausal women administered 3 g of a 0.3% DHEA emulsion or placebo twice daily on the skin for 12 months

Group	SCR/Day 1	Day 28	3 months	6 months	9 months	12 months
(A) DHEA (ng/ml)						
Placebo	2.04 ± 0.12 (74)	2.02 ± 0.13 (73)	1.60 ± 0.09 (72)	2.12 ± 0.13 (71)	1.82 ± 0.12 (64)	2.10 ± 0.22 (63)
DHEA 0.3%	1.69 ± 0.09 (73)	5.84 ± 0.27 (72)	4.82 ± 0.25 (72)	4.98 ± 0.27 (71)	5.35 ± 0.31 (64)	4.53 ± 0.26 (63)
(B) 5-DIOL (ng/ml)						
Placebo	0.27 ± 0.02 (74)	0.27 ± 0.02 (73)	0.26 ± 0.02 (72)	0.26 ± 0.02 (71)	0.24 ± 0.02 (64)	0.26 ± 0.02 (62)
DHEA 0.3%	0.23 ± 0.01 (73)	0.69 ± 0.03 (72)	0.65 ± 0.03 (72)	0.65 ± 0.04 (71)	0.62 ± 0.03 (64)	0.59 ± 0.03 (63)

Data are expressed as means ± S.E.M. Number in parenthesis represents number of subjects.

thighs, for a total dose of 3.0 ml of DHEA emulsion twice daily. For each woman, blood sampling was performed at the same time in the morning (±10 min) throughout the study, with the exception of the blood sample collected at screening visit which was taken in the morning or afternoon up to 3 weeks prior to study initiation (day 1). On day 1 of the study, blood sampling was performed within 2 h prior to the first application of placebo or DHEA creams. The application of the cream was performed after blood sampling.

2.2. Mass spectrometry steroid assays

Serum steroid levels of DHEA, DHEA-S, androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (5-diol), dihydrotestosterone (DHT), testosterone, androstenedione (4-dione), estrone (E₁), E₁-S, androsterone glucuronide (ADT-G), androstane-3 α , 17 β -diol-3G (3 α -diol-3G) and 3 α -diol-17G were measured at the Laboratory of Molecular Endocrinology, CHUL Research Center Research by mass spectrometry as described [21].

2.3. Statistical analysis

The means and standard errors (S.E.M.) of serum concentrations were calculated for each group and timepoints. The difference detectable with 80% power ($\alpha=0.05$, two-tailed) between the treatments was determined. Statistical significance was determined according to the multiple-range test of Duncan–Kramer [25]. Comparison of serum values between the

placebo and DHEA-treated groups was made at 1, 3, 6, 9 and 12 months of treatment. The mean serum values and 5th–95th centiles in 47 normal cycling premenopausal women 30–35 years old are provided to illustrate normal ranges observed in normal young women as well as the normal ranges observed in postmenopausal women for Figs. 3B, 4A and 4B [20].

3. Results

As illustrated in Fig. 1A and shown in Table 1, serum DHEA increased from 1.69 ± 0.09 ng/ml at pre-treatment measured at screening and on day 1 to an average of 5.12 ± 0.17 ng/ml for months 1, 3, 6, 9 and 12 ($p \leq 0.01$ at all time intervals). Five-diol, the compound immediately derived from DHEA by the action of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, increased in a parallel fashion from 0.23 ± 0.01 ng/ml to an average of 0.64 ± 0.02 ng/ml, for an increase of 178% over control ($p \leq 0.01$) (Fig. 1B). The same figures illustrate the means as well as the 5th and 95th centile values of DHEA and 5-diol in 30–35 years-old women [20], thus showing that both steroids remain within the values observed in normal premenopausal women. It should already be mentioned that the serum values of DHEA and 5-diol after oral or percutaneous administration of DHEA have been found to be at least a 100% overestimate of the changes in the parameters of physiological importance, namely the formation of active sex steroids [21,22]. In fact, as will be seen later, changes much smaller than those of DHEA and 5-diol are seen for the steroids having biological activity, especially E₂ and testosterone.

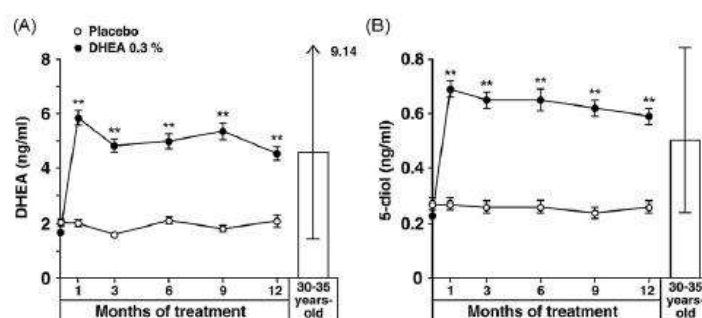


Fig. 1. Serum levels of (A) dehydroepiandrosterone (DHEA) and (B) androst-5-ene-3 β , 17 β -diol (5-diol) in 60–65 year-old postmenopausal women following twice daily applications on the skin of 3.0 g of 0.3% DHEA emulsion or placebo for 12 months. Data are expressed as means ± S.E.M. Serum steroid levels in 30–35 years-old women (means and 5th and 95th percentiles) are added for comparison. ** $p < 0.01$, experimental vs. pre-treatment values at screening and day 1 before DHEA application.

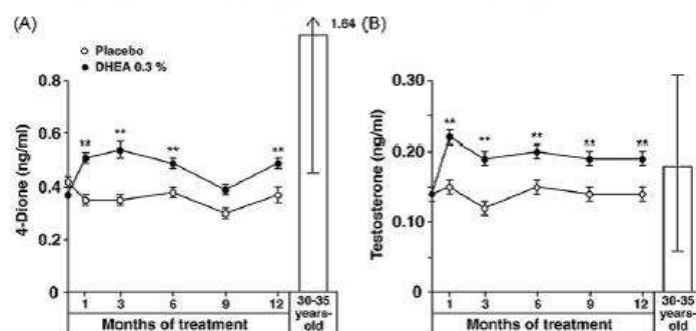


Fig. 2. Serum levels of (A) androstenedione (4-dione) and (B) testosterone in 60–65 year-old postmenopausal women following twice daily applications on the skin of 3.0 g of 0.3% DHEA emulsion or placebo for 12 months. Data are expressed as means \pm S.E.M. Serum steroid levels in 30–35 year-old women (means and 5th and 95th percentiles) are added for comparison. ** $p < 0.01$, experimental vs. pre-treatment values at screening and day 1 before DHEA application.

As illustrated in Fig. 2B, serum testosterone increased from 0.14 ± 0.01 ng/ml to an average of 0.20 ± 0.01 ng/ml (43% increase), a value almost superimposable to the serum testosterone concentration of 0.18 ± 0.07 ng/ml found in normal premenopausal women and well within the limits of serum testosterone observed in 55–65 year-old postmenopausal women (0.14 ± 0.07 ng/ml, 5th–95th centiles = 0.06 and 0.26 ng/ml) [20]. Serum 4-dione, on the other hand, remained much below the values found in normal premenopausal women (Fig. 2A). The concentration of this steroid, a direct product of DHEA through the action of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase rose from 0.37 ± 0.01 ng/ml to an average of 0.49 ± 0.02 ng/ml, or a 32% increase (Table 2). In addition to being much below the values found in premenopausal women, these 4-dione concentrations are also well within the 4-dione concentration found in postmenopausal women.

Serum DHT increased from 0.037 ± 0.003 ng/ml to an average of 0.065 ± 0.003 ng/ml (74% increase, $p < 0.01$) (Fig. 3A, Table 3). The change in serum E_2 , on the other hand, was only statistically significant ($p < 0.05$) at the 1 month interval. Serum E_2 remained within the values found in normal 55–65 year-old postmenopausal women during the whole treatment period (Fig. 3B). In fact, serum E_2 increased from 4.03 ± 0.29 pg/ml to an average of 4.73 pg/ml (N.S.), while the average serum E_2 levels in normal postmenopausal women are 4.17 ± 0.17 pg/ml with 5th and 95th percentile values of 1.0 and 9.3 pg/ml (Fig. 3B).

As illustrated in Fig. 4A, serum E_1 increased from 18.1 ± 0.94 pg/ml to an average of 23.3 ± 1.67 pg/ml, a statistically significant difference being seen at 1 and 12 months only (average 30% increase) (Table 4). Serum E_1 -S, on the other hand, showed non-statistically significant changes from 0.215 ± 0.025

Table 2

Changes in serum 4-dione (A) and testosterone (B) levels in 60–65 year-old postmenopausal women administered 3 g of a 0.3% DHEA emulsion or placebo twice daily on the skin for 12 months

Group	SCR/Day 1	Day 28	3 months	6 months	9 months	12 months
(A) 4-Dione (ng/ml)						
Placebo	0.42 ± 0.02 (74)	0.35 ± 0.02 (73)	0.35 ± 0.02 (72)	0.38 ± 0.02 (71)	0.30 ± 0.02 (64)	0.37 ± 0.03 (63)
DHEA 0.3%	0.37 ± 0.01 (73)	0.51 ± 0.02 (72)	0.54 ± 0.03 (72)	0.49 ± 0.02 (71)	0.39 ± 0.02 (64)	0.49 ± 0.02 (63)
(B) Testosterone (ng/ml)						
Placebo	0.14 ± 0.01 (74)	0.15 ± 0.01 (73)	0.12 ± 0.01 (72)	0.15 ± 0.01 (71)	0.14 ± 0.01 (64)	0.14 ± 0.01 (63)
DHEA 0.3%	0.14 ± 0.01 (73)	0.22 ± 0.01 (72)	0.19 ± 0.01 (72)	0.20 ± 0.01 (71)	0.19 ± 0.01 (64)	0.19 ± 0.01 (63)

Data are expressed as means \pm S.E.M. Number in parenthesis represents number of subjects.

Table 3

Changes in serum DHT (A) and E_2 (B) levels in 60–65 year-old postmenopausal women administered 3 g of a 0.3% DHEA emulsion or placebo twice daily on the skin for 12 months

Group	SCR/Day 1	Day 28	3 months	6 months	9 months	12 months
(A) DHT (ng/ml)						
Placebo	0.041 ± 0.004 (74)	0.037 ± 0.002 (73)	0.036 ± 0.002 (72)	0.035 ± 0.003 (71)	0.031 ± 0.003 (64)	0.037 ± 0.003 (63)
DHEA 0.3%	0.037 ± 0.003 (73)	0.075 ± 0.005 (72)	0.066 ± 0.003 (72)	0.061 ± 0.003 (71)	0.058 ± 0.003 (64)	0.062 ± 0.003 (63)
(B) E_2 (pg/ml)						
Placebo	3.22 ± 0.20 (74)	2.87 ± 0.22 (73)	2.96 ± 0.22 (72)	3.07 ± 0.21 (71)	2.48 ± 0.18 (64)	2.89 ± 0.27 (63)
DHEA 0.3%	4.03 ± 0.29 (73)	5.24 ± 0.38 (72)	4.90 ± 0.29 (72)	4.72 ± 0.31 (71)	4.04 ± 0.33 (64)	5.06 ± 0.47 (63)

Data are expressed as means \pm S.E.M. Number in parenthesis represents number of subjects.

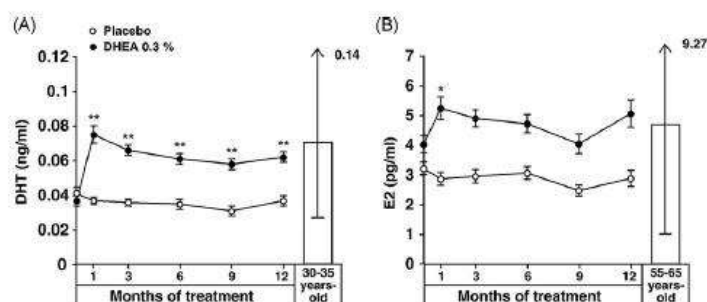


Fig. 3. Serum levels of (A) dihydrotestosterone (DHT) and (B) 17 β -estradiol (E₂) in 60–65 year-old postmenopausal women following twice daily applications on the skin of 3.0 g of 0.3% DHEA emulsion or placebo for 12 months. Data are expressed as means \pm S.E.M. Serum steroid levels in 30–35 year-old women (A) and 55–65 year-old women (B) (means and 5th and 95th percentiles) are added for comparison. * p < 0.05; ** p < 0.01, experimental vs. pre-treatment values at pre-screening and day 1 before DHEA application.

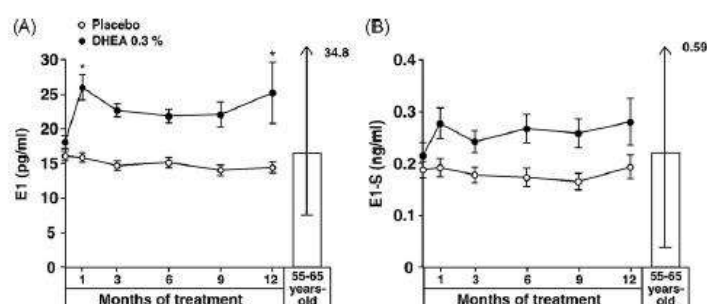


Fig. 4. Serum levels of (A) estrone (E₁) and (B) estrone sulphate (E₁-S) in 60–65 year-old postmenopausal women following twice daily applications on the skin of 3.0 g of 0.3% DHEA emulsion or placebo for 12 months. Data are expressed as means \pm S.E.M. Serum steroid levels in 55–65 year-old women (means and 5th and 95th percentiles) are added for comparison. * p < 0.05, experimental vs. pre-treatment values at screening and day 1 before DHEA application.

to an average of 0.259 ± 0.023 ng/ml (average 20% increase) over the 12-month period (Fig. 4B). Serum DHEA-S, on the other hand, showed minimal changes from 0.545 ± 0.033 ng/ml to an average of 0.72 ± 0.033 ng/ml (32% increase, p < 0.01 at all time intervals) (Fig. 5A). As can be seen in the same figure, all these values remain within the range observed in postmenopausal women [20], much below the levels found in premenopausal women.

As illustrated in Fig. 5B, serum ADT-G, the metabolite accounting for approximately 90% of all androgen metabolites, increased by 70% going from 13.9 ± 1.19 ng/ml at pre-treatment to an average of 23.6 ± 1.70 ng/ml (Table 5). Serum 3 α -diol-3G, on the other hand, increased from 0.53 ± 0.04 ng/ml to

an average of 0.93 ± 0.06 ng/ml (75% increase) (Fig. 6A) while serum 3 α -diol-17G increased from 0.51 ± 0.04 ng/ml to 0.97 ± 0.08 ng/ml (90% increase) (Fig. 6B, Table 6). In both cases, the values observed under DHEA treatment remain well below the concentrations found in normal premenopausal women.

Fig. 7 summarizes the increase in serum DHEA and eleven of its metabolites. It can be clearly seen that while serum DHEA increases by 203% over control, the sum of ADT-G, 3 α -diol-3G and 3 α -diol-17G increases by only 71% over control. The estrogens E₂, E₁ and E₁-S, on the other hand, show an even smaller and sometimes non-significant increase of 17%, 30% and 20% over pre-treatment values.

Table 4

Changes in serum E₁ (A) and E₁-S (B) levels in 60–65 year-old postmenopausal women administered 3 g of a 0.3% DHEA emulsion or placebo twice daily on the skin for 12 months

Group	SCR/Day 1	Day 28	3 months	6 months	9 months	12 months
(A) E ₁ (pg/ml)						
Placebo	16.09 \pm 0.72 (74)	15.85 \pm 0.74 (73)	14.68 \pm 0.70 (72)	15.12 \pm 0.76 (71)	14.01 \pm 0.79 (64)	14.40 \pm 0.80 (63)
DHEA 0.3%	18.07 \pm 0.94 (73)	25.95 \pm 1.83 (72)	22.67 \pm 0.94 (72)	21.82 \pm 1.04 (71)	22.06 \pm 1.83 (64)	25.18 \pm 4.45 (63)
(B) E ₁ -S (ng/ml)						
Placebo	0.188 \pm 0.016 (74)	0.192 \pm 0.018 (73)	0.178 \pm 0.015 (72)	0.173 \pm 0.018 (71)	0.165 \pm 0.016 (64)	0.193 \pm 0.023 (63)
DHEA 0.3%	0.215 \pm 0.025 (73)	0.277 \pm 0.030 (72)	0.242 \pm 0.021 (72)	0.267 \pm 0.027 (71)	0.258 \pm 0.028 (64)	0.280 \pm 0.045 (63)

Data are expressed as means \pm S.E.M. Number in parenthesis represents number of subjects.

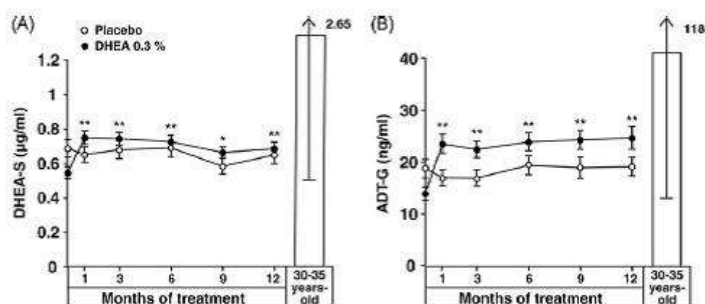


Fig. 5. Serum levels of (A) dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S) and (B) androsterone glucuronide (ADT-G) in 60–65 year-old postmenopausal women following twice daily applications on the skin of 3.0 g of 0.3% DHEA emulsion or placebo for 12 months. Data are expressed as means \pm S.E.M. Serum steroid levels in 30–35 year old women (means and 5th and 95th percentiles) are added for comparison. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, experimental vs. pre-treatment values at screening and day 1 before DHEA application.

Table 5

Changes in serum DHEA-S (A) and ADT-G (B) levels in 60–65 year-old postmenopausal women administered 3 g of a 0.3% DHEA emulsion or placebo twice daily on the skin for 12 months

Group	SCR/Day 1	Day 28	3 months	6 months	9 months	12 months
(A) DHEA-S (μ g/ml)						
Placebo	0.687 \pm 0.052 (74)	0.651 \pm 0.045 (73)	0.679 \pm 0.051 (72)	0.691 \pm 0.053 (71)	0.583 \pm 0.045 (64)	0.650 \pm 0.052 (63)
DHEA0.3%	0.545 \pm 0.033 (73)	0.749 \pm 0.037 (72)	0.744 \pm 0.037 (72)	0.726 \pm 0.037 (71)	0.663 \pm 0.032 (64)	0.685 \pm 0.038 (63)
(B) ADT-G (ng/ml)						
Placebo	18.75 \pm 1.81 (74)	16.97 \pm 1.53 (73)	16.90 \pm 1.57 (72)	19.35 \pm 1.80 (71)	18.90 \pm 2.03 (64)	19.09 \pm 1.78 (63)
DHEA0.3%	13.88 \pm 1.19 (73)	23.47 \pm 1.81 (72)	22.43 \pm 1.60 (72)	23.87 \pm 1.71 (71)	24.26 \pm 1.82 (64)	24.64 \pm 2.19 (63)

Data are expressed as means \pm S.E.M. Number in parenthesis represents number of subjects.

Table 6

Changes in serum 3 α -diol-3G (A) and 3 α -diol-17G (B) levels in 60–65 year-old postmenopausal women administered 3 g of a 0.3% DHEA emulsion or placebo twice daily on the skin for 12 months

Group	SCR/Day 1	Day 28	3 months	6 months	9 months	12 months
(A) 3 α -diol-3G (ng/ml)						
Placebo	0.64 \pm 0.05 (74)	0.62 \pm 0.06 (73)	0.67 \pm 0.06 (72)	0.63 \pm 0.05 (71)	0.58 \pm 0.06 (64)	0.66 \pm 0.06 (63)
DHEA 0.3%	0.53 \pm 0.04 (73)	0.94 \pm 0.07 (72)	0.96 \pm 0.06 (72)	0.92 \pm 0.07 (71)	0.94 \pm 0.08 (64)	0.96 \pm 0.09 (63)
(B) 3 α -diol-17G (ng/ml)						
Placebo	0.60 \pm 0.05 (74)	0.55 \pm 0.05 (73)	0.62 \pm 0.05 (72)	0.56 \pm 0.05 (71)	0.58 \pm 0.06 (64)	0.62 \pm 0.06 (63)
DHEA 0.3%	0.51 \pm 0.04 (73)	1.07 \pm 0.11 (72)	0.99 \pm 0.08 (72)	0.93 \pm 0.09 (71)	1.01 \pm 0.09 (64)	0.93 \pm 0.10 (63)

Data are expressed as means \pm S.E.M. Number in parenthesis represents number of subjects.

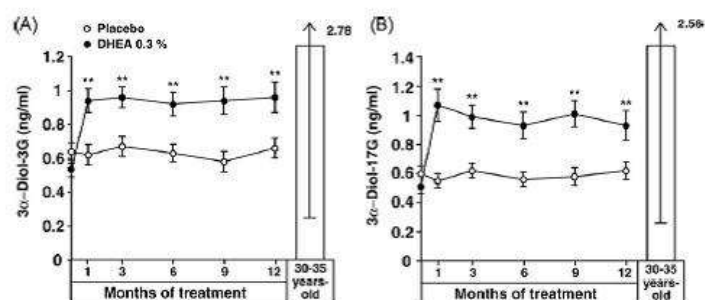


Fig. 6. Serum levels of (A) androstane-3 α , 17 β -diol-3-glucuronide (3 α -diol-3G) and (B) androstane-3 α , 17 β -diol-17 glucuronide (3 α -diol-17G) in 60–65 year-old postmenopausal women following twice daily applications on the skin of 3.0 g of 0.3% DHEA emulsion or placebo for 12 months. Data are expressed as means \pm S.E.M. Serum steroid levels in 30–35 year-old women (means and 5th and 95th percentiles) are added for comparison. ** $p < 0.01$, experimental vs. pre-treatment values at screening and day 1 before DHEA application.

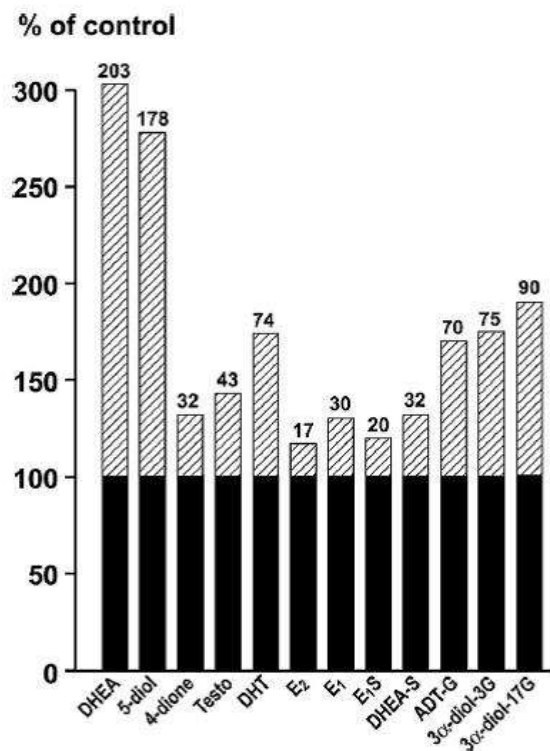


Fig. 7. Changes in the average serum levels of DHEA and eleven of its metabolites measured at 1, 3, 6, 9 and 12 months compared to pre-treatment concentrations of the same steroids at screening and day 1. The values are expressed as % of increase over pre-treatment values in 60–65 year-old women receiving twice daily applications on the skin of 3.0 g of a 0.3% DHEA emulsion or placebo. The number above the bars indicate the % change over basal (pre-treatment) control levels.

4. Discussion

The present data describe for the first time the long-term pharmacokinetics of DHEA and eleven of its metabolites measured by mass spectrometry. In addition, these data have been obtained in a prospective placebo-controlled randomized study performed under Good Clinical Practice rules with 63 women in each group completing the 12-month study.

The present 12-month clinical trial shows that the average change in serum DHEA is 203% over control while the corresponding change in the sum of the androgen metabolites is only 71%, thus showing a 186% overestimate of the changes of serum DHEA compared to total androgen formation. In fact, the sum of ADT-G, 3α-diol-3G and 3α-diol-17G goes from 14.92 ± 1.23 ng/ml at pre-treatment to an average of 25.46 ± 1.78 ng/ml during the 12-month treatment period of DHEA administration. Such data indicate that at the dose used, the efficacy of transformation of exogenous DHEA is only 35% compared to the transformation of endogenous DHEA under basal conditions.

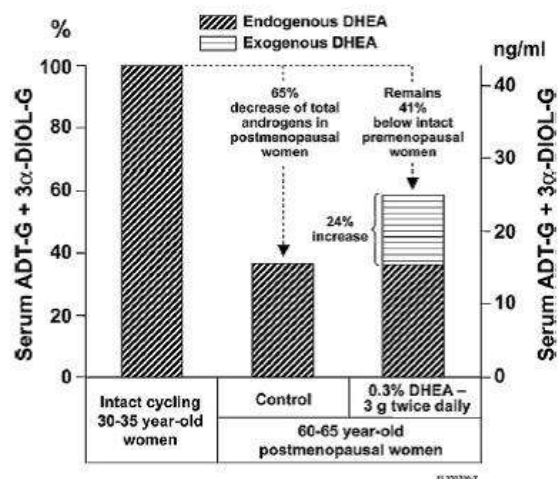


Fig. 8. Changes in the sum of the androgen metabolites ADT-G, 3α-diol-3G and 3α-diol-17G in 60–65-year-old postmenopausal women receiving twice daily applications on the skin of 3.0 g of a 0.3% DHEA emulsion. Comparison is made with the androgen pool in 30–35 year-old normal cycling women taken as 100%. The 65% loss in the androgen pool is compensated by only 24%, thus leaving postmenopausal women receiving such treatment with a total androgen pool 41% below that of normal premenopausal women. Contrary to the correction of the androgen pool limited to one third, serum DHEA increases to a value found in premenopausal women, thus indicating the limited transformation of DHEA into active androgens and even more into estrogens which show minimal and usually non-statistically significant changes.

This important phenomenon was first recognized in our previous study using three increasing concentrations of a DHEA emulsion applied on the skin for 3 months [21]. The data then showed that the efficacy of DHEA transformation into androgens decreased from an arbitrary value of 100% at basal endogenous serum DHEA levels of 1.80 ng/ml to a low efficacy of approximately 45% at 12.5 ng/ml serum DHEA [21]. In fact, a complete saturation of the enzymatic process catalyzing the formation of androgens from DHEA was observed at 7.9 ng/ml DHEA, a value well within the serum DHEA levels found in normal premenopausal women where the 5th and 95th percentiles are 1.53 and 9.14 ng/ml [20].

The present data show a 35% efficacy of DHEA transformation at a serum DHEA concentration of 5.12 ± 0.17 ng/ml, a serum DHEA concentration almost superimposable to the value of 4.47 ± 2.19 ng/ml found in normal 30–35-year-old women (Fig. 1A). Such data are extremely important for the choice of a therapeutically effective dose of DHEA in postmenopausal women using serum DHEA as marker of the appropriate replacement dose. As demonstrated by the present data, using the changes in serum DHEA would lead to the choice of a dose having only 35% the planned therapeutic effect, thus likely leading to no clinically significant benefit.

This limited transformation of exogenous DHEA into androgens can be more easily seen in Fig. 8 that shows that while the sum of ADT-G, 3α-diol-3G and 3α-diol-17G decreases by 65% from 42.85 ± 4.47 ng/ml in 30–35-year-old normal premenopausal women [20] to 14.92 ± 1.23 ng/ml in post-

menopausal women, the 203% increase in serum DHEA (or return to normal premenopausal values) observed in the present study is accompanied by an increase of the sum of the androgen metabolites to only 25.46 ± 1.78 ng/ml (24% increase), thus remaining 41% below the value found in normal premenopausal women. In fact, the present data show that despite the correction of serum DHEA to the levels found in normal premenopausal women by percutaneous administration of 3 g of a 0.3% DHEA emulsion twice daily, the transformation of the inactive adrenal precursor is only 35% efficient compared to the metabolism of endogenous DHEA, thus leading to only a 24% correction of androgen formation and leaving total androgen formation 41% below the values found in premenopausal women.

Assuming linearity and the absence of the saturation previously observed to be reached at 7.9 ng DHEA/ml [21], a 3-fold higher dose of DHEA leading to serum DHEA levels of 12 ng/ml would be needed to completely compensate for the lack of androgens found in 60- to 65-year-old women. The plateau of DHEA transformation found in Labrie et al. [21] does however indicate that complete compensation for the loss of androgens is unlikely to be possible. A conclusion of even more limited transformation of DHEA is observed for estrogens as reflected by the changes in serum E_1 -S which are even of smaller amplitude than those of androgens.

The traditional concept of androgen and estrogen secretion in women assumed that all sex steroids were transported by the general circulation following secretion by the ovaries before reaching the target tissues. According to this traditional concept, it was erroneously believed that the active sex steroids could be measured directly in the blood, thus providing a potentially easily accessible measure of the general exposure to sex steroids. In fact, this concept is valid only in the animal species lower than the primates where the gonads are the exclusive source of sex steroids [19]. This traditional concept does not apply to humans, especially postmenopausal women, where all estrogens and almost all androgens are made locally from DHEA in the peripheral tissues which possess, in a tissue-specific fashion, the enzymes required to synthesize the physiologically active sex steroids needed for proper tissue function. Such local biosynthesis and action of androgens in target tissues eliminates the exposure of other tissues to androgens and thus minimizes the risks of undesirable masculinizing or other androgen-related side-effects.

The use of the sum of ADT-G, 3α -diol-3G and 3α -diol-17G has been validated previously, starting in Labrie et al. [20] and confirmed in Labrie et al. [21] and Labrie et al. [22]. The active androgens made in peripheral target tissues are inactivated locally into the metabolites ADT and 3α -diol that are further metabolized into the corresponding glucuronide [20,24]. These metabolites can be measured with precision and accuracy in the circulation by mass spectrometry, thus providing the only valid estimate of androgenic activity in women [20] and men [23].

Using the serum concentrations of ADT-G, 3α -diol-3G and 3α -diol-17G as estimates of total androgens, the sum of the average serum concentrations of these conjugated metabolites is 35.34 ng/ml in 69- to 80-year-old men [23] compared to 17.0 ng/ml in 55- to 65-year-old women [20]. Although the

metabolic clearance rate of the three main androgen metabolites is likely to show differences between men and women, an estimate of the relative amount of total androgens in women and men calculated on the basis of the sum of the serum concentrations of these three metabolites suggests that total androgen production in women is approximately 50% of that found in men [20,23].

The presence of relatively high levels of androgens in women suggests that androgens play a major but so far underestimated physiological role in women. Moreover, since the testicular secretion of androgens in men shows little decline with age while women rely almost exclusively on adrenal DHEA for their production of androgens, the 70–95% fall in serum DHEA after menopause leads to a major androgen deficiency in postmenopausal women, a situation which aggravates with increasing age.

While ADT-G, 3α -diol-3G and 3α -diol-17G are likely to be made in variable proportions in different tissues, the changes observed after DHEA administration are usually parallel for the three metabolites [21,22]. It is thus reasonable to believe that the metabolites of estrogens other than E_1 -S will also behave similarly. While it is clear that the changes in androgen formation are much lower (71% compared to a 203% increase over control for DHEA), the change in serum E_1 -S is even lower with a non-statistically significant increase of only 20% (Fig. 4B). Such data are in agreement with our previous studies showing that DHEA is predominantly transformed into androgens in postmenopausal women [5,11,21,22,26].

References

- [1] F. Labrie, *Intracrinology*, Mol. Cell. Endocrinol. 78 (1991) C113–C118.
- [2] C.J. Migeon, A.R. Keller, B. Lawrence, T.H. Shepart II., Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma. Effect of age and sex: day-to-day and diurnal variations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 17 (1957) 1051–1062.
- [3] N. Orentreich, J.L. Brind, R.L. Rizer, J.H. Vogelman, Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59 (1984) 551–555.
- [4] A. Bélanger, B. Candas, A. Dupont, L. Cusan, P. Diamond, J.L. Gomez, F. Labrie, Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 1086–1090.
- [5] F. Labrie, A. Belanger, L. Cusan, J.L. Gomez, B. Candas, Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2396–2402.
- [6] E.D. Schriock, C.K. Buffington, G.D. Hubert, B.R. Kurtz, A.E. Kitabchi, J.E. Buster, J.R. Givens, Divergent correlations of circulating dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone with insulin levels and insulin receptor binding, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (1988) 1329–1331.
- [7] D.L. Coleman, E.H. Leiter, R.W. Schwizer, Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice, *Diabetes* 31 (1982) 830–833.
- [8] J.E. Nestler, C.O. Barfascini, J.N. Clore, W.G. Blackard, Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (1988) 57–61.
- [9] E.G. MacEwen, I.D. Kurzman, Obesity in the dog: role of the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA), *J. Nutr.* 121 (1991) S51–S55.
- [10] A. Tchernof, J.P. Després, A. Bélanger, A. Dupont, D. Prud'homme, S. Moorjani, P.J. Lupien, F. Labrie, Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men, *Metabolism* 44 (1995) 513–519.

- [11] F. Labrie, Drug Insight: breast cancer prevention and tissue-targeted hormone replacement therapy, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3 (2007) 584–593.
- [12] E.E. Baulieu, G. Thomas, S. Legrain, N. Lahlou, M. Roger, B. Debuire, V. Faucounau, L. Girard, M.P. Hervy, F. Latour, M.C. Leaud, A. Mokrane, H. Pitti-Ferrandi, C. Trivalle, O. de Lacharriere, S. Nouveau, B. Rakoto-Arison, J.C. Souberbielle, J. Raison, Y. Le Bouc, A. Raynaud, X. Girerd, F. Forette, Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 4279–4284.
- [13] A.J. Morales, J.J. Nolan, J.C. Nelson, S.S. Yen, Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (1994) 1360–1367.
- [14] D.T. Villareal, J.O. Holloszy, Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial, *JAMA* 292 (2004) 2243–2248.
- [15] P. Diamond, L. Cusan, J.L. Gomez, A. Bélanger, F. Labrie, Metabolic effects of 12-month percutaneous DHEA replacement therapy in postmenopausal women, *J. Endocrinol.* 150 (1996) S43–S50.
- [16] F. Labrie, P. Diamond, L. Cusan, J.L. Gomez, A. Bélanger, Effect of 12-month DHEA replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 3498–3505.
- [17] J. Poortman, J.H. Thijssen, A.A. von Landeghem, M.A. Wiegerinck, G.P. Alsbach, Subcellular distribution of androgens and oestrogens in target tissue, *J. Steroid Biochem.* 19 (1983) 939–945.
- [18] F. Labrie, A. Dupont, A. Bélanger, Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer, in: V.T. de Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg (Eds.), *Important Advances in Oncology*, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1985, pp. 193–217.
- [19] B. Bélanger, A. Bélanger, F. Labrie, A. Dupont, L. Cusan, G. Monfette, Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men, *J. Steroid Biochem.* 32 (1989) 695–698.
- [20] F. Labrie, A. Bélanger, P. Bélanger, R. Bérubé, C. Martel, L. Cusan, J.L. Gomez, B. Candas, I. Castiel, V. Chaussade, C. Deloche, J. Leclaire, Androgen glucuronides, instead of testosterone, as the new markers of androgenic activity in women, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99 (2006) 182–188.
- [21] F. Labrie, A. Belanger, P. Belanger, R. Berube, C. Martel, L. Cusan, J. Gomez, B. Candas, V. Chaussade, I. Castiel, C. Deloche, J. Leclaire, Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103 (2007) 178–188.
- [22] F. Labrie, A. Belanger, C. Labrie, B. Candas, L. Cusan, J.L. Gomez, Bioavailability and metabolism of oral and percutaneous dehydroepiandrosterone in postmenopausal women, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 107 (2007) 57–69.
- [23] L. Vandenput, F. Labrie, D. Mellstrom, C. Swanson, T. Knutsson, R. Pecker, O. Ljunggren, E. Orwoll, A.L. Eriksson, J.E. Damber, C. Ohlsson, Serum levels of specific glucuronidated androgen metabolites predict BMD and prostate volume in elderly men, *J. Bone Miner. Res.* 22 (2007) 220–227.
- [24] A. Bélanger, G. Pelletier, F. Labrie, O. Barbier, S. Chouinard, Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans, *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (2003) 473–479.
- [25] C.Y. Kramer, Extension of multiple range tests to group means with unique numbers of replications, *Biometrics* 12 (1956) 307–310.
- [26] F. Labrie, A. Belanger, L. Cusan, B. Candas, Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2403–2409.

Original article

Single agent activity of oxaliplatin in heavily pretreated advanced epithelial ovarian cancer

P. Chollet,¹ M. A. Bensmaïne,² S. Brienza,³ C. Deloche,¹ H. Curé,¹ H. Caillet⁴ & E. Cvitkovic⁴

¹Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand; ²Sanofi Winthrop, Gentilly; ³Debiopharm, Charenton Le Pont; ⁴Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

Summary

Background: Platinum-containing chemotherapy combinations achieve high response rates in women with advanced ovarian cancer. Unfortunately, most patients need further therapeutic options. Oxaliplatin (L-OHP) is a diaminocyclohexane (DACH) platinum analog active against human and murine cells *in vitro* and *in vivo*, including ovarian cells lines, with non-cross resistance characteristics with first (CDDP) and second (CBDCA) generation platinum compounds. The single agent activity of oxaliplatin in 34 consecutive platinum-pretreated ovarian cancer patients, not eligible for other phase II trials, was explored in a compassionate use program framework in a single institution.

Materials and methods: Thirty-five patients (34 of them eligible) were treated by L-OHP at the median initial dose of 100 mg/sqm q 3 weeks (5 patients: 58–89 mg/m²; 24 patients: 90–100 mg/m²; 6 patients: 120–130 mg/m²) by short (30–2 hours) i.v. infusion; the treatment was repeated every three weeks until treatment limiting toxicity or disease progression.

Results: Thirty-one patients (median previous chemotherapy lines: 3) were evaluable for antitumoral activity, with a 29% objective response rate. According to Markman's cri-

teria, objective partial responses were seen in six out of 13 evaluable potentially platinum-sensitive patients (46%) and three responses in the 18 evaluable platinum-resistant patients (17%). The tolerance was excellent, with no grade 3–4 (WHO) leukoneutropenia despite previous ABMT and abdominopelvic radiotherapy in six and eight cases, respectively. There was no renal or ototoxicity, and nausea/vomiting were moderate. The only grade 3 (WHO) peripheral neuropathy recorded concerned a patient with a neurotoxicity status grade 2 at baseline.

Conclusion: The 29% ORR single agent activity of oxaliplatin at hematological subtoxic doses in heavily pretreated ovarian cancer patients, with objective responses in platinum refractory patients, supports experimental data on non cross-resistance and a differential clinical toxicity profile to other available platinum compounds. The 12 month median overall survival of this poor prognosis patients cohort (62% platinum-refractory patients, median number of three previous chemotherapy lines) gives a strong empirical basis for the further exploration of oxaliplatin's role in confirmatory phase II and combination chemotherapy studies.

Key words: advanced ovarian cancer, oxaliplatin, salvage therapy

Introduction

Salvage chemotherapy after platinum-based treatment of recurrent ovarian carcinoma typically results in low response rates and short survival, with a very small fraction of women with recurrent advanced ovarian cancer surviving beyond two years [1].

Few alternative treatment options existed till recently for patients who developed progression or recurrence following first-line chemotherapy. However, some prognostic factors that are predictive for therapeutic response to second-line therapy have been identified.

The *de novo* or acquired pharmacologic resistance to platinum analogs is the most important determinant of prognosis and long term survival of this patient population [2–4].

A freedom from progression interval longer than 18

to 24 months with respect to initial treatment corresponds to a higher percentage of therapeutic response and longer survival durations [5, 6].

The relative chemosensitivity of ovarian cancer has been used in the development of new anticancer agents. In the last five years, hexamethylmelamine [7], paclitaxel [8], docetaxel [9] and topotecan [10], have been either approved in this indication, or reported to be active, after platinum-based treatment failure.

Diaminocyclohexane platinum (DACH) compounds synthesized 20 years ago [11] seem to have a similar mechanism of cytotoxicity as first and second generation platinum compounds, but their markedly differential *in vitro* cytotoxic profile has recently led to the proposal of classifying them as a separate family of cytotoxic compounds [12].

Oxaliplatin is of particular interest, since it is the only DACH platinum currently in clinical phase II–III

development [13]. Its non-cross or partial resistance characteristics with CDDP or CBDCA was demonstrated both *in vitro* and *in vivo* in human cancer cell lines [14, 15], and its interaction with CDDP or CBDCA was shown to be supraditive and synergistic in the same models [16, 17].

Clinical data have shown that oxaliplatin lacks renal or auditory toxic effects and exhibit minimal hematotoxic effects at recommended doses [18, 19]. Its main side effect is acute, cold-triggered dysesthesias and cumulative neurosensorial toxicity. Its reported activity in ovarian cancer patients within a broad screening phase II experience [13] led us to evaluate its antitumoral activity in a consecutive series of heavily pretreated recurrent ovarian cancer patients without viable therapeutic choices. These patients had either failed or were considered ineligible for simultaneously ongoing phase II studies and were consequently enrolled in a single agent compassionate-use program framework.

Materials and methods

Eligibility criteria

To be eligible for treatment, patients were required to have a pathologically confirmed advanced epithelial ovarian cancer, recurrent after or failing to achieve an objective response to adequately dosed cisplatin and/or carboplatin-based chemotherapy.

Patients with secondary clinical resistance to available platinum-based chemotherapy were also eligible, as were patients who had previously received paclitaxel.

It is noteworthy that poor performance status (PS ≤ 2), borderline renal function (upper normal limit serum creatinine $< 2.5 \times$ normal (WHO)), previous grade 1–2 (WHO) peripheral neuropathy related to the previous chemotherapy, poor bone marrow reserve secondary to multiple prior chemotherapy lines, often after high dose chemotherapy including CBDCA (with need for hematopoietic growth factor/cellular support), were not considered exclusion criteria from the present program. Indeed, such characteristics made such patients ineligible for formal phase II studies and/or at high risk for aggressive salvage chemotherapy combinations.

Patient population

From May 1989 to January 1995, 35 patients seen at the Centre Jean Perrin with advanced ovarian cancer were enrolled in this study. One patient has been considered non-eligible after inclusion, since retrospective evaluation failed to confirm histological proof of epithelial ovarian cancer. This patient is evaluable for toxicity, but excluded from activity assessment analysis.

Patient and disease characteristics are summarized in Table 1. All patients except one had previously received at least one combination chemotherapy regimen containing cisplatin and/or carboplatin, with a median number of previously administered chemotherapy regimens of 3 (1–6). Cisplatin had been previously administered to 33 patients with a median cumulative dose of 536 mg/sqm (range: 94–1085). Carboplatin had been previously given to 27 patients with a median cumulative dose of 1177 mg/sqm (range 174–2765), and was part of high-dose chemotherapy regimens (with autologous bone marrow transplantation) in six of them. Taxanes (paclitaxel) had previously been given to five patients, none of them achieving an objective response to such treatment.

Twenty-one patients had documented platinum refractory disease according to Markman's criteria [5], that is failure to respond to

treatment or disease progression within six months after discontinuation following a response. Ten patients were classified as primary, and 11 as secondary resistant, while 13 patients were potentially sensitive to platinum therapy.

Thirty-two of 34 ovarian cancer patients had macroscopically measurable and/or evaluable disease. In the two other patients with known peritoneal disease, an increase of CA 125 serum level had accurately reflected previously progressive disease, and the antitumoral activity of oxaliplatin could be assessed solely by the marker's evolution.

The majority of patients had bulky tumor masses, with multiple sites of disease at treatment initiation (Table 1).

Toxicity and activity assessment

The toxicity was graded according to WHO criteria. Assessment of antitumor response was performed at each treatment cycle by a physical examination and a serum CA 125 determination, and every two–three cycles by CT scan and/or echosonography. Responses were defined according to WHO guidelines as follows: CR was defined as the complete disappearance of all detectable malignant disease for at least four weeks. PR was defined as a $> 50\%$ decrease in the sum of the products of the diameters of measurable lesions for at least four weeks. No simultaneous increase in the size of any lesion

Table 1. Patient and disease characteristics.

Total number of patients	35
Median age (years)	62
Range	(27–77)
Performance status (WHO)%	
0–1	67
2–4	33
Prior chemotherapy lines	
Median number/patients (range)	3 (1–6)
Total number/patient	
1	2
2	13
3	9
4	8
≥ 5	3
Previous CDDP	
Number of patients	33
Median dose (mg/sqm) (range)	536 (94–1085)
Previous CBDCA	
Number of patients	27
Median dose (mg/sqm) (range)	1177 (174–2765)
Previous ABMT + HDCT	6
Previous abdominopelvic radiotherapy	8
Previous taxanes (paclitaxel)	5
Clinical platinum resistance status*	
Potentially sensitive	13
Secondary refractory	11
Primary refractory	10
Non-evaluable	1
Non-eligible	1
Clinical taxanes resistance	5
Type of site involved	
Abdominopelvic	26
Lymph nodes	13
Liver	6
Lung/pleural	4
CA125 tumor marker level	
Normal (N)	4
CA 125 $> 1.N < 10.N$	13
CA 125 $\geq 10.N < 100.N$	14
CA 125 $\geq 100.N$	4

* Markman criteria [5].

or tumor marker, or appearance of any new lesion could occur. SD was defined as less than 25% change in measurable disease with the absence of new lesions. Progressive disease (PD) was defined as an increase of >25% in the size of a measurable lesion or the appearance of an unequivocal new lesion.

Duration of response was determined by the interval between the first day on treatment and the first date disease progression was objectively documented. The survival was calculated from the beginning of the treatment until the death. All major responses were reviewed by a panel that consisted of a reference radiologist (H.C.) and a medical oncologist (E.C.) external to the institution.

Treatment and follow-up

Before therapy, all patients had a complete medical history and underwent a physical examination. Baseline laboratory studies included complete blood cell count/platelets, serum chemistries and CA 125 determination. While CBC were done weekly while on treatment, CA 125 and LFTs were repeated every cycle. Imaging assessment was done every two-three cycles. Other imaging and specialized tests were performed only if clinically indicated.

Oxaliplatin was provided on an individual request, compassionate-use basis by Debiopharm (Lausanne/Switzerland). It was diluted in 500 ml of 5% dextrose and infused over 20 minutes (28 patients) or 2 hours (seven patients), every three to four weeks.

The initial phase I trial by Mathé et al. with intrapatient dose escalation, had a minimally active dose as recommended dosage endpoint [20] established as 67–90 mg/m² q 3 weeks given as a slow bolus (15'–20'). An orthodox phase I trial by Extra et al. [19] defined the recommended dose as 130 mg/m² q 3 weeks given as a 2-hour i.v. infusion [19]. Lower starting doses (<90 mg/m²) were used in the first patients of the present series, but once the safety and tolerance were established at higher dose levels, the starting dose was increased. There were five patients treated at the dose range of 58–89 mg/m²/cycle, 24 patients received 90–100 mg/m²/cycle, and 6 patients were treated with 120–130 mg/m²/cycle. Minor (<10%) empirical dose adjustments were done occasionally, according to peripheral neuropathy, renal function and/or subjectively estimated bone marrow reserve resulting from previous cisplatin and/or carboplatin based treatments.

Antiemetic prophylactic treatment consisted in anti HT3 often supplemented with steroids, with rare instances of associated metoclopramide and benzodiazepines.

Results

Toxicity

Thirty-five patients received 222 cycles of oxaliplatin with a median number of cycles per patient of 5 (range 1–27) and a median total oxaliplatin dose of 424 mg/sqm (range 125–1911).

All patients and treatment cycles were evaluable for toxicity, except one patient lost to follow-up after a single oxaliplatin administration. Table 2 lists the maximum toxicity grades per cycle and per patient.

Myelosuppression was mild to moderate, without grade 3–4 leukopenia, despite previous ABMT including high-dose CBDCA in 6 (17%) of patients.

Grade 3–4 anemia and thrombocytopenia were seen in 3% and 1.5% of cycles, respectively, clustered in the six patients mentioned above.

Grade 3 diarrhea was seen in 9% of patients and 3% of cycles, without grade 4 episodes.

The clinical profile of oxaliplatin neurotoxicity, as reported in phase I–II studies, has already been described [19].

Oxaliplatin related acute dysesthesias were observed in most of patients (82% of cycles and 79% of patients). These accral symptoms (hands, feet and perioral area) began within a few hours after the end of the infusion and were mild (61% of patients, 71% of cycles) or moderate (15% of patients, 10% of cycles) in the majority of cases. They were transient, lasting a few minutes, but they could reappear (rarely) again the next day or over the following week, mainly triggered by exposure to cold.

The only grade 3 neurosensory toxicity seen concerned one patient with a grade 2 baseline neuropathy status. Seven patients had a grade 1 (WHO) baseline neuropathy, with no increase of this toxicity under therapy by oxaliplatin. Although, prior to treatment, seven patients had presented a residual grade 1 renal function (WHO), no renal toxicity was observed during or after oxaliplatin treatment.

Activity

Thirty-four pretreated, progressing on treatment, ovarian cancer patients entered the trial (32 with measurable/evaluable disease). Twenty-nine of them were assessable for antitumoral activity. The causes for non-evaluability were treatment and follow-up refusal after one cycle in three patients, while two patients had non-measurable/evaluable disease, except elevated serum CA 125 levels (255 × and 490 × fold upper normal value limits).

There were nine objective responses, all of them partial, for an ORR of 29% in evaluable patients, and 26.5% when calculated for all 34 eligible patients. Eight patients were assessed as disease stabilization, including the two patients with exclusive CA 125 marker decrease as sole tumoral status gauge.

Thirty patients had baseline CA 125 elevation (≥2 × normal upper value – range 2–800 × NI).

Six of seven objective responders with abnormally elevated baseline CA 125 had a corroborating decrease, one of them remaining stable. Amongst the seven disease stabilizations with elevated markers base-

Table 2. Oxaliplatin tolerance (WHO) [25] in 35 patients/222 cycles.

Toxicity	Grade (WHO)				
	0 % Pt (% cycle)	1 % Pt (% cycle)	2 % Pt (% cycle)	3 % Pt (% cycle)	4 % Pt (% cycle)
Leukopenia	53 (74)	29 (19)	17 (7)	0	0
Neutropenia	50 (74)	35 (21)	15 (5)	0	0
Anemia	21 (54)	50 (36)	17 (7)	6 (2)	6 (1)
Thrombopenia	76 (91)	6 (45)	9 (3)	9 (1.5)	0
Nausea-vomiting	35 (66)	17 (17)	35 (14)	13 (3)	0
Diarrhea	79 (83)	9 (11)	3 (3)	9 (3)	0
Neurological	21 (18)	61 (71)	15 (10)	3 (1)	0

line CA 125, four had a $\geq 50\%$ decrease in CA 125 (including the two patients with the marker as the sole disease indication), the remaining three having marker stabilization.

Antitumoral objective activity was analysed according to clinical platinum resistance status (Markman's criteria) [5] (Table 3): there were six responses among thirteen potentially sensitive patients (46%) while three of 18 platinum refractory evaluable patients also experienced an objective response (3/18 = 17%). One response was observed among the three evaluable paclitaxel refractory patients. When looking at evidence of objective response by site, there were 5/13 tumoral lymph nodes, 5/26 abdominopelvic localizations, and 1/6 hepatic metastases assessed as responding.

By initial oxaliplatin dose level, there was one PR in the five patients treated in the 58–89 mg/m²/cycle range, eight PR amongst the 23 eligible patients treated in the 90–100 mg/m²/cycle range, and no responses seen in the three evaluable patients treated at 120–130 mg/m²/cycle. Amongst the nine objective responders to oxaliplatin, three had failed to respond (1 PD, 2 SD) to the last previous cisplatin/carboplatin based chemotherapy while five had responded to it (4 CR, 1 PR), the information being unavailable in the remaining one.

As of April 1996, nine patients are alive. The median survival of the whole cohort is 12 months (range 2–54+).

Discussion

Ovarian cancer patients with previous multiple recurrences may respond to a number of second-line chemotherapeutic treatments [21], including cisplatin and carboplatin [22, 23]. The aim of single agent salvage chemotherapy in this setting remains palliative, with quality-of-life preservation or improvement constituting a major goal [22].

The efforts to overcome clinical failure and drug resistance of platinum species had mainly focused on dose intensification [23–25]. In patients whose relapsing disease was treated with carboplatin alone at standard doses (300–400 mg/sqm), no response was seen in patients resistant to cisplatin, while some activity was confirmed in cases of late relapses (> 12 months) [25]. An absence of response was seen in patients for whom first-line treatment with cisplatin or carboplatin-containing regimens had also failed. A major factor of response likelihood to salvage chemotherapy in ovarian cancer is the progression-free interval after primary therapy [5].

In the past decade, there has been a focus in the search for new active drugs in ovarian cancer, particularly agents without cross-resistance with available platinum derivatives. It is important to establish the order of clinical evidence of non cross-resistance between chemotherapeutic agents, since this may help to design more effective regimens.

Table 3. Antitumoral activity (WHO) according to Markman's criteria [5].

Clinical platinum resistance status*	Patient number	Response				
		CR	PR	SD	PD	NEV
Potentially sensitive	13	–	6	2 + 1*	4	–
Primary refractory	10	–	–	2	5	3
Secondary refractory	11	–	3	2 + 1 ^b	5	–
Total	34	–	9	8	14	3
Previous taxanes (paclitaxel)	5	–	1	1	1	2

* According to the Markman criteria.

^b Clinicobiological response.

The development of new platinum compounds with putative non cross-resistance to cisplatin has flourished in the last decade. The DACH family, of interest for its limited partial cross-resistance to cisplatin, has provided two compounds reaching clinical development. Trials with tetraplatin were stopped after a prohibitive neurotoxicity was observed during phase I [26]. Oxaliplatin, synthesised by Kidani, has demonstrated a non cross-resistance with cisplatin or carboplatin both *in vitro* and *in vivo* in human cell lines [14, 15]. Evidence of oxaliplatin clinical activity in cisplatin-resistant ovarian cancer has been previously reported by Misset et al. [13]. This differs significantly from carboplatin, iproplatin, zeniplatin and lobaplatin, all of which demonstrated clinical cross-resistance with cisplatin [25, 28–31].

Our reported L-OHP/CDDP (biplatin) experience supports the preclinically perceived synergistic cytotoxic effect between cisplatin and oxaliplatin [32], while also showing the potential feasibility for oxaliplatin-containing multiple drug combinations, the latter being partially motivated by the present report's data.

Although the monocentric compassionate use experience we report is by no means a formal phase II study, the present data validate oxaliplatin as an active single agent in heavily pretreated ovarian cancer patients. Indeed, most patients were treated below the currently recommended dose of 130 mg/sqm q3 weeks, recently approved in France for the treatment of pretreated 5-fluorouracil refractory colorectal cancer patients [33]. Most patients in this cohort were not eligible for, or had failed, simultaneously ongoing phase II trials with paclitaxel. The reasons for ineligibility were linked to the number of previous chemotherapy lines, to borderline major organ function and/or poor bone marrow reserve.

After an external response review, the objective response rate was 29% (31% in evaluable patients) (CI 95%: 15–50), with 19% disease stabilizations. Our data confirm that oxaliplatin has clinical non-cross resistance characteristics in a substantial proportion of patients with cisplatin refractory disease at hematologically subtoxic levels. Moreover, oxaliplatin's favorable

therapeutic index makes it particularly attractive combinations chemotherapy.

The issue of oxaliplatin's single agent activity in platinum refractory ovarian cancer is being clarified by two ongoing trials. The first, a French phase II study at the recommended-dose of 130 mg/sqm \times q 3 weeks, has eligibility criteria based on clinical resistance to cisplatin and/or carboplatin. The second, a randomized phase II/III study between paclitaxel (175 mg/sqm) and oxaliplatin (130 mg/sqm), is presently conducted by the EORTC Gynecologic Group, also limited to patients having progressed while on or within 12 months of cisplatin- and/or carboplatin-based treatment.

We consider our data encouraging. While awaiting verification through further phase II studies, they suggest the need to further explore the role of oxaliplatin in first-line therapy for the treatment of advanced ovarian cancer.

Acknowledgment

Thanks to Ms M. Tavernier for her reviewing and editing assistance.

References

- Sutton GP, Stehman FB, Einhorn LH et al. Ten years follow-up of patients receiving cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide (PAC) chemotherapy for stage III and IV advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1989; 7: 223-9.
- Pater JL, Carmichael JA, Krepart GV et al. Second-line chemotherapy of stage III-IV ovarian carcinoma. A randomized comparison of melphalan to melphalan and hexamethylmelamine in patients with persistent disease after doxorubicin and cisplatin. *Cancer Treat Rep* 1987; 71: 277-81.
- Ozols RF, Young RC. Ovarian cancer. Chemotherapy of ovarian cancer. *Semin Oncol* 1991; 18: 222-32.
- Markman M, Rothman R, Hakes T et al. Second-line platinum therapy with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991; 9: 389-93.
- Markman M, Hoskins W. Responses to salvage chemotherapy in ovarian cancer: A critical need for precise definitions of the treated population. *J Clin Oncol* 1992; 10: 513-4.
- Gore ME, Friatt I, Wiltshaw E et al. Treatment of relapsed carcinoma of the ovary with cisplatin or carboplatin following initial treatment with these compounds. *Gynecol Oncol* 1990; 36: 207-11.
- Schink JC, Harris LS, Grosen ER et al. Altretamine (hexalen) an effective salvage chemotherapy after paclitaxel (Taxol) in women with recurrent platinum resistant ovarian cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1995; 14: 275 (Abstr 770).
- Thigpen JT, Blessing JA, Ball H et al. Phase II trial of paclitaxel in patients with progressive ovarian carcinoma after platinum-based chemotherapy: A Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1748-53.
- Kavanagh J, Kudelka A, Freedman R et al. Taxotere (docetaxel): Activity in platinum-refractory ovarian cancer and amelioration of toxicity. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994; 13: 237 (Abstr 732).
- Armstrong D, Rowinsky R, Donehower R et al. A phase II trial topotecan as salvage therapy in epithelial ovarian cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1995; 14: 275 (Abstr 769).
- Burchenal JH, Lokys L, Turkevich J et al. 1,2-Diaminocyclohexane platinum derivatives of potential clinical value. Recent results. *Cancer Res* 1980; 74: 146-55.
- Myers TG, Paull KD, Fojo AT et al. Multivariate analysis of high-flux screening data using the DISCOVER computer program package: Integrated analysis of activity patterns and molecular structure features of platinum complexes. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1994; 35: 371.
- Misset JL, Kidani Y, Gastiburu J et al. Oxalatoplatinum (L-OHP): Experimental and clinical studies. In Howell SB (ed): *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, 374. New York: Plenum Press 1991.
- Pendyala L, Creaven PJ. *In vitro* cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer Res* 1993; 53: 5970-6.
- Alvarez M, Ortuzar W, Rixe O et al. Cross resistance patterns of cell lines selected with platinum suggest differences in the activities and mechanisms of resistance of platinum analogues. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1994; 35: 439.
- Mathé G, Chenu E, Bourut C et al. Experimental study of three platinum complexes: CDDP, CBDCA and L-OHP on L1210 leukemia. Alternate or simultaneous association of two platinum complexes. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1989; 30: 872.
- Ortuzar W, Paull K, Rixe O et al. Comparison of the activity of cisplatin (CP) and oxaliplatin (OXALI) alone or in combination in parental and drug resistant sublines. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1994; 35: 332.
- Brienza S, Vignoud J, Itzhaki M. Oxaliplatin (L-OHP): Global safety in 682 patients. Proceedings of the Seventh International Symposium on Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy. Amsterdam 1995 (Abstr 140).
- Extra JM, Espie M, Calvo F et al. Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer. *Chemother Pharmacol* 1990; 25: 299-303.
- Mathé G, Kidani Y, Misset JL et al. Phase I trial of oxalatoplatinum (L-OHP): A new trial design with dose escalation in each patient. *Proc AACR* 1986; 27: 190 (Abstr A752).
- Neijt JP, Ten Bokkel Huinuk WW, Van der Burg MEL et al. Long term survival in ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1367-72.
- Markman M, Rothman R, Hakes T et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991; 9: 389-93.
- Ozols RF, Ostchega Y, Curt G et al. High-dose carboplatin in refractory ovarian patients. *J Clin Oncol* 1987; 5: 197-201.
- Ozols RF, Ostchega Y, Myers CE et al. High-dose cisplatin in hypertonic saline in refractory ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1246-50.
- Kavanagh JJ, Nicaise C. Carboplatin in refractory epithelial ovarian cancer. *Semin Oncol* 1989; 16 (Suppl 5): 45-8.
- Schilder RJ, LaCreta FP, Perez RP et al. Phase I and pharmacokinetics study of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812) administered on a day 1 and day 8 schedule. *Cancer Res* 1994; 54: 709-17.
- Burchenal JH, Lokys L, Turkevich J et al. 1,2-Diaminocyclohexane platinum derivatives of potential clinical value. Recent results. *Cancer Res* 1980; 74: 146-55.
- Weiss G, Green S, Alberts DS et al. Second-line treatment of advanced measurable ovarian cancer with iproplatin: A Southwest Oncology Group study. *Eur J Cancer* 1991; 27(2): 135-8.
- Willemsse PHB, Gieterna JA, Mulder NH et al. Zeniplatin in patients with advanced ovarian cancer: A phase II study with a third generation platinum complex. *Eur J Cancer* 1993; 29A(3): 359-62.
- Gieterna JA, Veldhuis GJ, Guchelaar HJ et al. Phase II and pharmacokinetic study of lobaplatin in patients with relapsed ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 1302-7.

32. Kavanagh JJ, Edwards CL, Freedman RS et al. A trial of loba-platin (D-19466) in platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecologic Oncol* 1995; 58: 106-9.
33. Misset JL, Soulié P, Férrière M et al. High activity of combined oxaliplatin (L-OHP) cisplatin (CP) as salvage treatment in pre-treated ovarian cancer (OC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994; 13: 273 (Abstr 876).
34. Louvet C, Bleiberg H, Gamelin E et al. Oxaliplatin (L-OHP) synergistic clinical activity with 5-fluorouracil (FU) in FU resistant colorectal cancer (CRC) patients (pts) is independant of FU \pm folinic acid (FA) schedule. *Proc Am Soc Clin Oncol* 15: 206, 1996 (Abstr 467).

Received 20 May 1996; accepted 30 October 1996.

Correspondence to:

Philippe Chollet, MD
Centre Jean Perrin
58, rue Montalembert
63011 Clermont-Ferrand
France

Treatment Results, Survival and Prognostic Factors in 109 Inflammatory Breast Cancers: Univariate and Multivariate Analysis

Jocelyne Attia-Sobol, Jean-Pierre Ferrière, Hervé Curé, Fabrice Kwiatkowski, Jean-Louis Achard, P. Verrelle, Viviane Feillel, Monique De Latour, Claudine Lafaye, Claire Deloche, Jacques Dauplat, Anne Doly, Raymond Rozan and Philippe Chollet

Between 1978 and 1987, 109 patients without metastatic disease were treated by induction chemotherapy for inflammatory breast cancer (IBC) or “neglected” locally advanced breast cancer (LABC): 62 patients had a clinical history of rapidly growing tumours (doubling time ≤ 4 months) and inflammatory signs; conversely, the 47 neglected patients had local inflammation with a longer history of LABC. 103 patients were fully evaluable. All patients received the same induction chemotherapy with doxorubicin, vincristine, cyclophosphamide and 5-fluorouracil. After six cycles, locoregional treatment was by radiotherapy if a complete or nearly complete response had been obtained, and total mastectomy, with pre or postoperative radiotherapy, in other cases. The chemotherapy after local treatment comprised of six cycles for LABC and 12 cycles for IBC (six without doxorubicin). With a median follow-up of 120 months, the median overall survival (OS) time was 70 months as against 45 months for disease-free survival (DFS). No difference was observed for OS and DFS between LABC and IBC. The regional recurrence rate was 24% (15% for radiotherapy alone). 20 factors of potential prognostic significance were evaluated by univariate and multivariate analysis. For DFS and OS, univariate analysis suggested a worse prognostic significance for “peau d’orange” appearance of the skin, clinical evidence of node involvement and poor response to chemotherapy after three cycles, on mammographic criteria. The cumulative dose of doxorubicin after three cycles seemed to have a significant effect on OS ($P < 0.03$) but was too closely correlated with age to draw definite conclusions. In the multivariate analysis, “peau d’orange”, menopausal status and clinical node involvement predicted DFS. “Peau d’orange” and clinical node involvement also predicted OS. Our results indicate that IBC and LABC do not behave differently when treated with our procedure.

Eur J Cancer, Vol. 29A, No. 8, pp. 1081–1088, 1993.

INTRODUCTION

INFLAMMATORY BREAST cancer (IBC) is an uncommon cancer constituting only 1–4% of breast cancer cases in western countries [1]; most of our knowledge comes from retrospective and prospective (single-armed) studies, devoid of control groups. IBC is characterised by a high rate of locoregional and mainly metastatic failures, which occur rapidly. With well-managed

locoregional treatment (surgery and/or radiotherapy) alone the overall survival (OS) may not exceed 5% at 5 years [1, 2]. Therefore, IBC has been considered to be a systemic disease, i.e. with micrometastasis at the time of diagnosis, requiring systemic treatment with combination chemotherapy. This effectively improves OS to within the range of 30–50% at 5 years [2–5].

Table 1. Clinical classification of patients according to TNM-UICC

Tumour size	N0	N1	N2	Supra clavicu- lar node	Doubling time < 4 months (IBC)		LABC
					Pev 2	Pev 3	
< 2 cm		1			1	0	0
2–5 cm	3	12	1	3	10	2	7
> 5 cm	25	53	6	5	33	16	40

All patients were T4d, due to the presence of clinical inflammatory signs. However, more details are given as tumour size, clinical node status and Pev classification.

Our purpose was to define more clearly the factors related to the risk of recurrence in IBC treated by chemotherapy, to evaluate the effectiveness of a combined modality approach using neoadjuvant chemotherapy, and to compare our group of IBC patients with a group of locally advanced breast cancer (LABC) patients with inflammatory signs which appeared in the later stages of a "neglected" tumour, and constituting also a group of patients of bad prognosis with a high recurrence and metastasis rate.

PATIENTS AND METHODS

Between January 1978 and December 1987, 109 patients with IBC, or secondary inflammatory LABC participated in this study. This retrospective work included two groups: 62 patients (group I) treated for IBC, and 47 patients (group II) for "neglected" breast cancer. Group I included patients showing clinical evidence of IBC, i.e. all were T4d for TNM-UICC; they were classified according to Denoix [6]; Pev2 for erythema, with or without oedema, localised to the tumoral area and Pev3 for inflammatory signs (erythema, oedema, warmth, pain) enlarged to the whole breast, when associated with a clinical history of rapidly growing tumour (doubling time \leq 4 months) [7–9]. Conversely, group II included patients with "neglected" tumour (doubling time from 4 months to a few years), all of whom presented secondary evidence of the same clinical inflammatory signs; all these patients could also be classified T4d according to TNM-UICC (Table 1).

Of the 109 patients, 103 were evaluable for response, 6 were excluded because of distant metastasis at referral (2 patients) and different treatments from the scheme proposed in this review—3 patients for primary surgery, and 1 patient for another combination chemotherapy.

Local malignancy was ascertained by breast biopsy for all patients. Tumour grading according to Scarff–Bloom–Richardson (SBR) was established for only 71 tumours, and hormonal receptor assays for 36 tumours (mostly at surgery).

We paid particular attention to "peau d'orange" appearance, but skin biopsy was deemed appropriate in only 12 cases: tumour emboli within the dermal lymphatic vasculature were noted in 7 of these 12 cases.

The staging was completed by general evaluation—bone scintigraphy, chest X-ray, and liver echography or scan.

Correspondence to P. Chollat.

The authors are at the Centre Jean Perrin and INSERM U 71, Rue Montalembert, B.P. 392, 63011 Clermont-Ferrand Cedex, France.

Revised 15 Sep. 1992; accepted 28 Dec. 1992.

The median age of the patients was 53.7 (range 32–79 years); 47 patients were premenopausal and 63 postmenopausal. Clinical evidence of lymph node involvement was noticed in 82 patients, confined to the axillary area (N1, N2) in 74 and extended to the supraclavicular region (M1) in 8 cases. Median follow-up was 120 months as of 1 July 1992.

The patient- and tumour-related variables taken into account were inflammatory signs (Pev2, Pev3, and "neglected" tumours), age, menopausal status, initial tumour size, clinical nodal stage and pathological involvement of axillary nodes, "peau d'orange" appearance, tumour differentiation, oestrogen and progesterone receptors, primary mammographic criteria, and family history of breast cancer.

Treatment

All the patients were treated by the same first combination chemotherapy: doxorubicin, 30 mg/m² day 1 (D1); vincristine, 1 mg/m² D2; cyclophosphamide, 300 mg/m² and 5-fluorouracil, 400 mg/m² D3 to D6. Treatment was repeated on the 28th day after D1, which marked the first day of the next cycle. After three to six cycles (mainly six cycles) the patients received a locoregional treatment according to clinical response: radiotherapy alone, if a complete or nearly complete response had been obtained, and total mastectomy, with pre- or postoperative irradiation, in all other cases (Fig. 1). Chemotherapy was resumed for six cycles for LABC and 12 cycles for IBC (six without doxorubicin).

Irradiation of the breast and lymphatic area (axillary, supraclavicular and internal mammary) was effected by opposed tangential beam of ⁶⁰Co. The average dose was 50 Gy, given for 5–6 weeks (2 Gy/day, 5 days/week).

Patients whose local treatment consisted of radiotherapy alone received an additional 25 Gy boost to the residual breast mass, using a reduced tangential cobalt beam, and 5–15 Gy to the axillary region (according to the initial clinical lymph node involvement). For those treated by surgery, an additional 5 Gy on the skin and in the axillary area was effected by cobalt beam and electrontherapy.

Additional hormonal therapy (tamoxifen 20–30 mg/day orally) was used in the initial treatment or after surgery for 20 postmenopausal patients in whom hormonal receptors (E₂) were detected (of whom 12 belonged to group II).

Evaluation

Clinical and paraclinical responses. Patients were evaluated after three cycles of primary chemotherapy, and reviewed again after the end of treatment. Response criteria are given in Table 2.

Clinical responses were evaluated according to developments in the size of tumour, lymph node and inflammatory signs, and were classified in the following five classes: complete response (CR), partial response > 50% (PR), moderate response < 50% (MR), no change (NC) and progression of disease (PD). The same classification was used for mammographic responses.

The disappearance of inflammatory signs (oedema, erythema, pain) with persistence of warmth was considered as a PR, as was the persistence of "peau d'orange" appearance without the other signs. In this last case, when the thickening of the skin on mammogram was unchanged, the response was classed as MR. When the clinical tumour had disappeared, leaving a tumoral residue which was discovered only at surgery, the response was classified as PR.

Statistical evaluation. In spite of only 103 out of 109 patients being evaluable for response, our analysis was performed on the

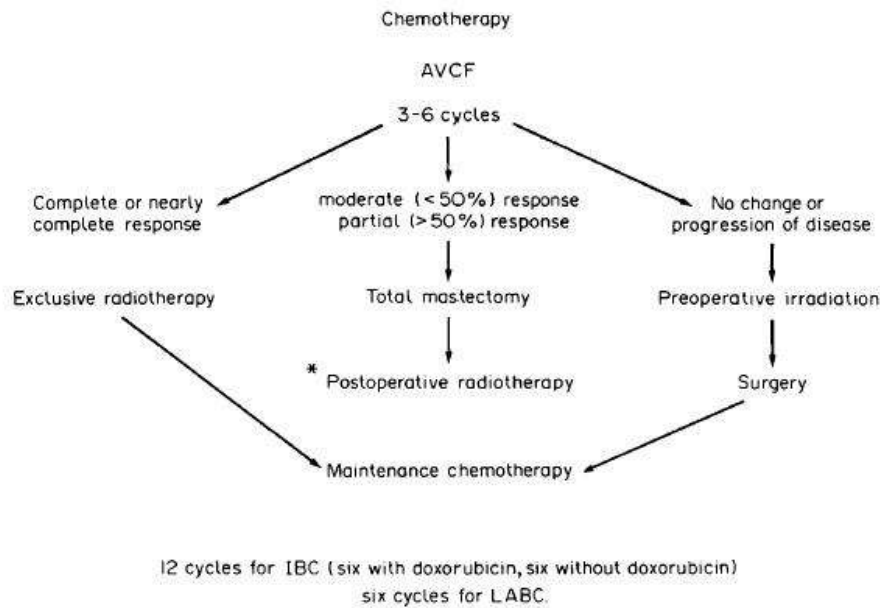


Fig. 1. Scheme of treatment. * In the case of massive axillary lymph node involvement, irradiation was performed at the end of chemotherapy. Number of all cycles of chemotherapy: 18 for IBC, 12 for LABC.

whole group. 20 variables were analysed (Table 2) in a univariate analysis using the Kaplan-Meier method [10] for calculating curves of OS and disease-free survival (DFS).

The time to failure or death was calculated from the date of the first examination, which was rapidly followed by chemotherapy (within 5 days). Comparisons between curves were made using the log rank test. The relative importance of prognostic factors on OS and DFS was estimated according to the Cox model [11].

A few patients were excluded for some particular parameters when lacking in the patient survey. Actual numbers for each statistical analysis are indicated in the text.

RESULTS

Patient and disease-related factors

Doubling time and inflammatory signs (Pev2, Pev3, LABC). The median OS for all patients was 70 months; at 5 years the actuarial survival rate was 55%. The median DFS was 44.9 months; at 5 years the actuarial disease-free survival rate was 44% (Fig. 2).

There was no significant difference in DFS and OS between the two groups of IBC (62 patients) and LABC (47 patients), nor in the subgroups Pev2 (44 patients) and Pev3 (18 patients) (Fig. 3).

As no difference in prognosis was observed between groups 1 and 2, both groups were studied together to assess the importance of other factors.

Age and menopausal status. Age was a significant factor in OS ($P < 0.03$) and DFS ($P < 0.02$) when the patients were separated into two groups (under 55 and over 55), with a significantly worse survival in older patients. Menopausal status was also significant for decreased DFS ($P < 0.02$) and OS ($P < 0.02$).

Tumour size. Tumour size is often difficult to estimate precisely in inflammatory breasts; Table 1 shows a predomi-

nance of large tumours. However, patients presenting with a small tumour (T1, T2) showed a significantly better overall survival rate ($P < 0.04$) and DFS ($P < 0.04$) than those with a larger tumour (Table 2), but, in the multivariate analysis, the Cox model did not retain it.

"Peau d'orange" as a main prognostic factor? Patients presenting a "peau d'orange" appearance (45 patients) showed a worse OS ($P < 0.0001$) and DFS ($P < 0.0001$) than patients devoid of this clinical sign (60 patients) (Fig. 4).

Lymph node involvement. A significant difference in OS ($P < 0.05$) was seen after grouping patients by no involvement (N0) versus evidence of clinical node involvement (N1b, N2, N3). DFS appeared to be significantly affected by this categorisation ($P < 0.03$). The lymph node involvement after chemotherapy was a significant factor on OS ($P < 0.02$) and DFS ($P < 0.01$).

Criteria on primary mammography. Together with clinical signs inflammatory signs were also considered: thickening of the skin (which corresponds with "peau d'orange" appearance), oedema, and hyperdensity of the whole gland. Thickening of the skin had no significant effect on overall survival ($P < 0.09$), and on DFS ($P = 0.30$); the other signs were insignificant.

The aspect of the tumour mass was also analysed (nodular, radial, or absence of tumour) as well as the uni- or plurifocality, and the presence of microcalcifications. All these criteria had no significant effect on OS or DFS.

Treatment-related factors

Response to induction chemotherapy after three cycles. Clinical response, measured by changes in tumour size had no significant impact on DFS or OS, although DFS was better for those in whom inflammatory signs resolved ($P < 0.04$). Mammographic response, which was evaluable in 89 patients did, however,

Table 2. Univariate analysis according to Kaplan–Meier's method

Factor	No.	Overall survival			Relapse-free survival		
		5-year (%)	Median (months)	<i>P</i>	5-year (%)	Median (months)	<i>P</i>
Inflammatory signs							
Pev2	44	61.4	74.6	0.75	54	—	0.20
Pev3	18	55.6	70.2		39	37	
LABC	47	48.9	64.6		36	38.3	
Age							
< 55	56	62	—	< 0.03	55	70	< 0.02
≥ 55	53	47	76.7		32	36.2	
Menopausal status							
Pre-	47	66	—	< 0.02	57	73.4	< 0.02
Post-	62	47	53		34	35.5	
"Peau d'orange"							
Yes	45	38	41.8	< 0.0001	29	25.5	< 0.0001
No	60	70	—		58	83.5	
Tumour							
T1	1	N/A	—	< 0.05	N/A	—	< 0.02
T2	13	77	—		69	—	
T3	29	69	103.2		52	61.2	
T4	66	44	45.9		35	31	
N stage (clinical)							
N0	28	75	112.4	< 0.05	61	81.2	0.20
N1	66	51	65.4		41	38.7	
N2	7	29	38	< 0.05	29	21	< 0.03
N3	8	37	41.5		25	30	
N1, N2, N3	82	47	53.8		37	36.6	
Grading (SBR)							
1	3	66	52.5	0.80	33	32	0.90
2	43	53	67.7		39	40	
3	25	56	69.2		48	45	
N involvement (pathology)							
Positive	52	46	52.9	< 0.01	31	34	< 0.001
Negative	23	78	—		70	—	
Oestrogen receptor							
Positive	22	64	75.9	0.81	45	51	0.90
Negative	14	61	—		50	52	
Progesterone receptor							
Positive	12	91	—	< 0.05	58	—	0.16
Negative	24	54	65.9		46	46	
Response after three cycles of induction chemotherapy based on mammographic criteria							
CR + PR	19	84	125.5	< 0.02	68	—	< 0.01
MR, NC, PD	70	49	55.4		38	36.2	
Clinical criteria							
Tumour							
CR + PR	21	65	89	0.14	52	56.2	0.17
MR, NC, PD	68	54	70		42	41	
Inflammatory signs							
CR + PR	51	64	93.7	0.22	49	55	< 0.04
MR, NC, PD	43	46	51.5		39	27	
Adjuvant chemotherapy							
Yes	84	65	100	0.04	51	64.5	< 0.03
No	11	27	39		27	22	
Criteria on primary mammography							
Inflammatory signs							
Skin thickening							
Yes	40	45	58.5	< 0.09	32	34	0.30
No	23	65	80		48	54.5	
Oedema							
Yes	32	47	51	0.87	40	35	0.71
No	31	58	74		35	45	
Hyperdensity							
Yes	31	51	63.4	0.94	36	35	0.36
No	30	53	61.4		40	39	

Continued overleaf

Table 2. Continued

Factor	No.	Overall survival			Relapse-free survival		
		5-year (%)	Median (months)	P	5-year (%)	Median (months)	P
Tumour mass							
Radial	50	58	69.6	0.50	48	52	0.30
Nodular	12	58	73		50	39	
Absence	35	51	62		34	37.2	
Plurifocality	17	53	63	0.89	47	46.5	0.88
Unifocality	80	54	66.9		41	38.9	
Microcalcifications							
Yes	45	53	68.2	0.57	40	41.5	0.67
No	49	57	69.2		45	44	
Family history of breast cancer (present)	38	62	75.6		52	60.9	
First degree relative (present)	29	60	71.4	0.60	47	52.3	0.27
No family antecedent	72	49	56.6		38	37.2	
Relative dose intensity of doxorubicin after three cycles							
≤ 0.70	24	37	37	< 0.02	29	29	< 0.05
≥ 0.71	76	62	81.5		49	52.9	
Total dose of doxorubicin (mg)							
≤ 450	37	43	51.5	< 0.03	35	35.5	< 0.03
> 450	59	71	105.5		56	71.5	

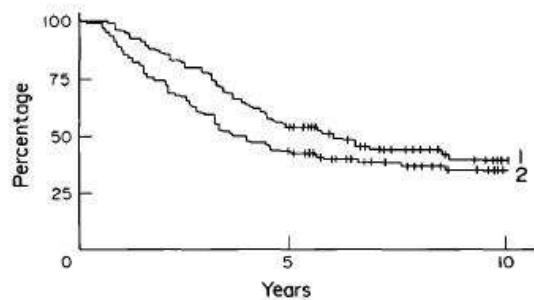


Fig. 2. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) of the 109 patients on 1 July 1991, according to Kaplan-Meier method. Curve 1: OS mean 65.6 months; median 71.2 months. Curve 2: DFS mean 55.6 months; median 44.9 months.

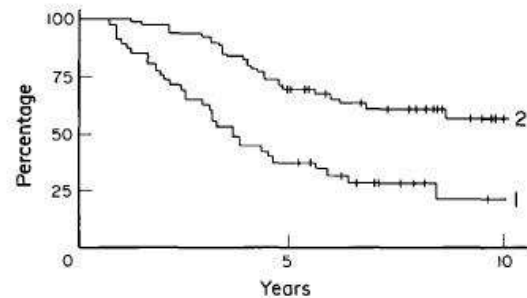


Fig. 4. Overall survival of patients with "peau d'orange" appearance (curve 1) or absence (curve 2). 1: 45 patients, mean 51.1 months; median 41.8 months. 2: 60 patients, mean 78.3 months; median 119.1 months. $P < 0.0001$ (Mantel-Haenszel test $\epsilon = 4.1$).

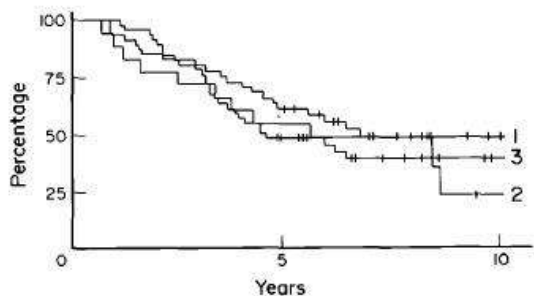


Fig. 3. Overall survival in three subgroups of patients (15 February 1991). 1: 44 patients classified PEV2, mean 69.9 months; median 78.9 months. 2: 18 patients classified PEV3, mean 67.1 months; median 67 months. 3: 47 patients classified LABC, mean 60.9 months; median 53 months. n.s. (log rank test $\chi^2 = 1.92$).

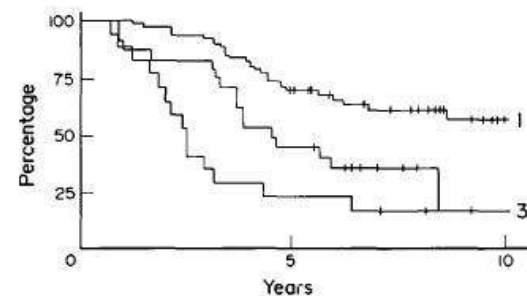


Fig. 5. Overall survival in patients presenting before treatment: Curve 1: (60 patients) without "peau d'orange", mean 78.3 months; median 119.1 months. Curve 2: (24 patients) "peau d'orange" without microcalcifications on mammogram, mean 57.4 months; median 53 months. Curve 3: (17 patients) "peau d'orange" and microcalcifications, mean 41.7 months; median 28.2 months. $P < 0.001$ according to Kaplan-Meier test ($\chi^2 = 24.8$).

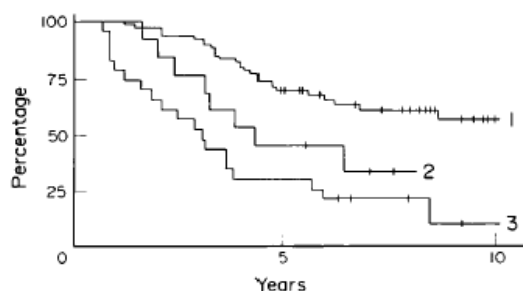


Fig. 6. Overall survival in patients presenting before treatment: Curve 1: (60 patients) without "peau d'orange", mean 98.3 months; median 119.1 months. Curve 2: (13 patients) "peau d'orange" without skin thickening on mammogram mean 56 months; median 48 months. Curve 3: (23 patients) "peau d'orange" and skin thickening, mean 44.2 months; median 35 months. $P < 0.001$ according to Kaplan-Meier test ($\chi^2 = 21.25$).

have a significant influence on both DFS ($P < 0.01$) and S ($P < 0.02$).

Dose intensity and total dose of doxorubicin. According to the method of Hryniuk and Bush [12], we calculated the dose intensity really received (DIRR) of each drug for each patient at three and six cycles as well as the relative dose intensity (RDI) for each drug, ratio: theoretical dose intensity (defined as 1)/actual days of treatment.

Doxorubicin DIRR at three cycles was the only drug with significant effect on OS ($P < 0.02$) and on DFS ($P = 0.05$); doxorubicin RDI was also significant for OS at six cycles ($P < 0.05$).

We analysed the patients in two groups, above and below a given doxorubicin RDI at three cycles (≤ 0.70 or ≥ 0.71). The group which received $RDI \geq 0.71$ (76 patients) had a better survival curve ($P < 0.02$) than the group with $RDI \leq 0.70$ (24 patients).

The total dose of doxorubicin administered was significant for OS ($P < 0.03$) and DFS ($P < 0.03$) by considering two groups with a given cumulative dose (≤ 450 mg and ≥ 451 mg).

Maintenance chemotherapy. Adjuvant postlocal treatment chemotherapy was significantly beneficial on DFS ($P < 0.03$) and on OS ($P = 0.04$). 11 patients (8 of whom refused) did not receive adjuvant treatment.

The total number of chemotherapy cycles (12 vs. 18) did not appear to be significant for OS. However, maintenance chemotherapy improved the DFS period (deferring relapse), although the difference was insignificant.

Treatment tolerance. Treatment tolerance was generally good, and there were no toxic deaths. Haematological tolerance of chemotherapy was generally good, except for 1 case of severe aplasia. In 3 cases, doxorubicin was discontinued due to the occurrence of electrocardiographic changes, but no congestive heart failure was observed. All patients developed alopecia. Nausea and vomiting were mild and controlled with antiemetics. We observed two pulmonary embolisms after surgery.

Locoregional treatment. Exclusive radiotherapy was carried out on 23 patients (7 CR, 10 PR, 4 MR, and 2 NC in mammographic criteria), for whom there was a clinical response consisting of the disappearance of inflammatory signs and no clinical tumoral residue.

Surgery was performed for 74 patients (absence of inflammatory signs, but with persistence of a tumour mass) and consisted of a modified radical mastectomy with axillary section, followed by radiotherapy.

6 patients had preoperative irradiation for progression or persistence of the tumour despite chemotherapy. Their survival was not significantly different. 3 other patients presented evidence of metastatic disease at 6 months and did not undergo any local treatment.

Local treatment failure and metastasis. 68 patients (62%) have relapsed, of whom 26 (24%) had a locoregional recurrence. This last figure represents 15% (4/26) of the patients treated by exclusive irradiation and 27% (21/69) of those treated by radiotherapy and surgery in conjunction. The median survival from the relapse was 16.9 months.

Systemic metastases were observed in 55 patients; located in the pleura and lung (16/54, 30%), bone (11/54, 20%), the brain (1/54, 2%), the liver (5/54, 9%), the ovaries (1/54, 2%) or at multiple sites (22/54, 41%) (associated sites of skin, bone, brain, lung and/or liver). Brain metastasis appeared to be frequently associated with other sites of metastasis in our study (19%). There was no significant difference between Pev2, Pev3, or LABC on the occurrence of metastasis or local failure.

DISCUSSION

IBC is the most aggressive form of primary breast cancer, and should be differentiated from LABC on natural history parameters. The natural course of IBC is completely different from that of LABC. Inflammatory signs appear rapidly in a previously healthy breast with a short delay between the observation of the first symptom and the seeking of medical attention (≤ 4 months) [7–9]; the tumour doubling time is short, (≤ 6 months by definition) [6].

In this report, the diagnosis of IBC is based on clinical criteria (T4d) as in other recent reports [4, 9, 16], but in accordance with the Pev classification [6], inflammatory signs were limited to the tumour area (Pev2) or extended to the whole breast (Pev3).

Our results suggest that Pev2 and Pev3 may not be differentiated, despite the fact that Pev2 is clinically less severe (or because of the small size of the Pev3 group). The clinical characteristics proposed by Haagensen [8], including redness and oedema of more than 33% of the mammary surface, could be used.

Conversely to IBC, LABC concerns "neglected" locally advanced breast cancers, with secondary appearance of inflammatory signs.

However, in spite of clinical and biological differences, IBC and LABC have similarities: the high incidence of failures in distant sites indicates that disseminated micrometastasis have already taken place at the time of diagnosis [8, 13, 14]. Therefore, they often receive the same type of treatment with induction chemotherapy. Our results with primary chemotherapy did not show significantly different behaviour between IBC and LABC in terms of DFS and OS, as previously suggested by some authors [14, 15].

The introduction of chemotherapy in the management of IBC had led to a significant improvement in patient outcome [1, 4, 5, 7, 23, 27]. In this study, median OS was 70 months with a DFS of 44.9 months. The 5-year survival rate appeared to be lengthened (55%) compared to most published treatments [4, 9, 24], but it is uncertain whether a plateau is obtained, and the survival curve may still decrease progressively.

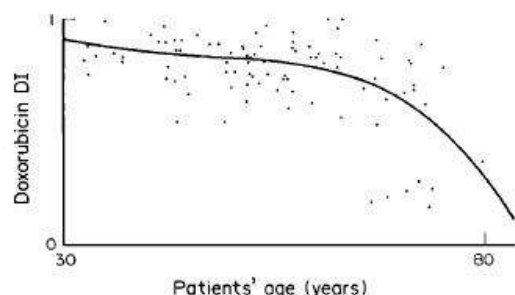


Fig. 7. Doxorubicin dose intensity at three cycles as a function of patient's age (correlation coefficient: $r = 0.528$; $P < 0.00001$).

The presence of "peau d'orange" was of negative prognostic significance for OS and DFS, as suggested in previous studies [25]; this sign is a major element in the current UICC-AJC staging system, but without practical consequences in staging; our results are in favour of considering it as a possible factor for subclassification.

Patients with clinically involved nodes (N1b, N2, N3) had a worse prognosis than those without (N0). Similar results have been reported by some authors [4, 25, 26], but not found by others [22, 27].

Menopausal status and age appeared to be significant for OS and DFS. But in the multivariate analysis, we found a higher risk of relapse for menopausal patients, as did Rouessé *et al.* [5]. Other authors [4, 16], have found that these factors do not influence prognosis.

Response to initial chemotherapy measured clinically was a poor indication of long-term outcome in our series, unlike several other studies [4, 13, 29]. However, mammographic response to chemotherapy at three cycles had a very important prognostic significance for DFS and OS, as reported elsewhere [4, 9, 20, 26, 29–31].

As for the dose intensity delivered at three and six cycles, doxorubicin dose intensity appeared to be the only significant drug factor at three cycles on OS and DFS. However, when separating patients under and over 55 years of age, it did not show any statistical significance. To eliminate this age effect (Fig. 7), we studied the doxorubicin DIRR with patients whose age was ≤ 65 years. Among them, patients receiving ≥ 0.70 of projected doxorubicin doses had a better OS with borderline significance ($P < 0.08$). We could conclude that dose intensity may be important, but its relationship with age makes interpretation difficult.

A multivariate analysis with a Cox model allowed classification of prognostic factors according to their significance: (1) "peau d'orange"; (2) microcalcifications; (3) thickening of the skin; (4) menopausal status; and (5) N stage. "Peau d'orange" associated with skin thickening worsened the prognosis (Fig. 6) ($P < 0.001$). The presence of breast microcalcifications also added a worse prognostic element when associated with "peau d'orange" (Fig. 5) ($P < 0.001$). Microcalcifications, which are known to correspond with tumoural necrosis, might be a factor of worse prognosis in this form of tumours, like necrosis in sarcoma [35].

This retrospective study confirmed the effectiveness of primary chemotherapy to obtain a longer survival in both LABC and IBC. Nowadays, several trials in this field use intensive chemotherapy, alone or associated with G/GM-CSF, or followed by bone marrow autografting.

- Grace WR, Cooperman AM. Inflammatory breast cancer. *Surg Clin North Am* 1985, 65, 151–160.
- Chauvergne J, Durand M, Dilhuydy MH, *et al.* Traitement des cancers du sein inflammatoires. Etude contrôlée d'un programme d'association thérapeutique. *Rev Fr Gyn Obstét* 1981, 76, 227–235.
- Hagelberg R, Jolly PC, Anderson R. Role of surgery in the treatment of inflammatory breast carcinoma. *Am J Surg* 1984, 148, 125–131.
- Chevallier B, Asselain B, Kunlin A. Inflammatory breast cancer. Determination of prognostic factors by univariate and multivariate analysis. *Cancer* 1987, 60, 897–902.
- Rouessé J, Spielman M, Le Chevalier T, *et al.* Chimiothérapie première dans le traitement des cancers du sein inflammatoires: 230 observations. *Presse Méd* 1987, 16, 475–478.
- Denoux P. Treatment of malignant breast tumors. *Recent Results in Cancer Res.* Berlin, Springer, 1970, 6–10.
- Hortobagyi GN. Progress in inflammatory breast cancer: cause for cautious optimism. *J Clin Oncol* 1986, 4, 1727–1729.
- Haagensen CD. Inflammatory carcinoma of the breast. In *Diseases of the Breast*. Philadelphia, Saunders, 1971, 576–584.
- Fastenberg NA, Buzdar AU, Montague ED. Management of inflammatory carcinoma of the breast. A combined modality approach. *Am J Clin Oncol (CCT)* 1985, 8, 134–141.
- Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from observations. *J Am Stat Assoc* 1958, 53, 457–481.
- Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B* 1972, 34, 187–202.
- Hrynuk W, Bush H. The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1984, 11, 1281–1288.
- Delarue JC, May-Levin F, Mouriessé H, *et al.* Oestrogen and progesterone cytosolic receptors in clinically inflammatory tumors of the human breast. *Br J Cancer* 1981, 44, 911–916.
- Delena M, Zucalli R, Ziganotti G, *et al.* Combined chemotherapy-radiotherapy approach in locally advanced T3 B-T4 breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1978, 1, 53–59.
- Kokal WA, *et al.* Inflammatory breast carcinoma: a distinct entity? *J Surg Oncol* 1985, 30, 152–155.
- Israel L, Breau JL, Morete JF. Two years of high dose cyclophosphamide and 5 fluorouracil followed by surgery after 3 months for acute inflammatory breast carcinomas. A phase II study of 25 cases with a median follow-up of 35 months. *Cancer* 1986, 57, 24–28.
- Leicht A. "Peau d'orange" in acute mammary carcinoma. Its cause in diagnostic value, 1909.
- Meyer AC, Dockerty MD, Harrington SW. Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Gyn Obstet* 1948, 87, 417–424.
- Saltzstein SL. Clinically occult inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 1974, 34, 382–388.
- Levine PH, Steinhorn C. Inflammatory breast cancer: the experience of the surveillance. Epidemiology and end results. *J Natl Cancer Inst* 1985, 74, 291–297.
- Lucas FV, Perez Mesa C. Inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 1978, 41, 1595–1605.
- Fields JN, Kuske RR, Perez CA, *et al.* Prognostic factors in inflammatory breast cancer. Univariate and multivariate analysis. *Cancer* 1989, 63, 1225–1232.
- Ferrière JP, Hanin A, Kwiatkowski F, *et al.* Inflammatory breast cancer. The experience of the Centre Jean Perrin. In Ragaz J, Ariel L, eds. *High Risk Breast Cancer Therapy*. Berlin, Springer 1991, 334–345.
- Fowle BW, Glover D, Rosato EF, *et al.* Combined modality treatment of inflammatory breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986, 12 (suppl), 151–152.
- Sarrazin D, Mouriessé H, Arriagada R, *et al.* Les facteurs cliniques de pronostic dans les cancers du sein. *Bull Cancer* 1977, 64, 477–486.
- Pouillart P, Palangie T, Jouve M, *et al.* Cancer du sein métastaté: rôle d'une immunothérapie par le BCG et durée de la phase de chimiothérapie intensive. *Bull Cancer* 1981, 68, 171–186.
- Zylberberg B, Salat-Baroux J, Ravina JH, *et al.* Inflammatory cancer of the breast. Assessment after 6 years of 16 patients treated by primary immunochemotherapy. *J Gyn Obstet Biol Reprod* 1985, 14, 615–621.
- Contesso G, Friedman S, Mouriessé H, *et al.* for the Breast Cancer Committee. The importance of histoprostic grading as a factor in long term survival in breast carcinoma. *ASCO Proc* 1987, 6, 50, abstract 194.
- Buzdar AU, Montague ED, Barker JL, *et al.* Management of

- inflammatory carcinoma of the breast with combined modality approach. An update. *Cancer* 1981, **47**, 2537–2542.
30. Buzdar AU, Hortobagyi GN, Montague E, *et al.* Short-term chemotherapy, surgery and radiotherapy in the management of inflammatory breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1986, **5**, 61.
 31. Hollender LF, Calderoli H, Bieber S, *et al.* Chimiothérapie pré et post-opératoire deans les cancers inflammatoires du sein. Analyse d'une série de 41 cas. *Chirurgie* 1986, **112**, 84–86.
 32. Ackland SP, Bitran JD, Dowlatsahi K. Management of locally advanced and inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Gyn Obstet* 1985, **161**, 399–408.
 33. Sherry MM, Johnson DH, Page DL, *et al.* Inflammatory carcinoma of the breast. Clinical review and summary of the Vanderbilt experience with multimodality therapy. *Am J Med* 1985, **3**, 355–364.
 34. Burton V, Cox B, Leight S. Inflammatory breast carcinoma. Effective multimodal approach. *Arch Surg* 1987, **122**, 1329–1332.
 35. Leyvraz S, Costa J. Issues in the pathology of sarcomas of the soft tissue and bone. *Sem Oncol* 1989, **16**, 273–280.